

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

KATEDRA ANORGANICKÉ CHEMIE

Studijní obor: Anorganická chemie



DIPLOMOVÁ PRÁCE

KOMPLEXY MAKROCYKlickÝCH LIGANDOV
COMPLEXES OF MACROCYCLIC LIGANDS

Bc. Michaela Buziková

Vedoucí závěrečné práce:
Prof. RNDr. Petr Hermann, Dr.

Praha, 2019

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 16.5.2019

Podpis:

Abstrakt

Makrocyclické ligandy jsou známy a studovány pro svoji schopnost vázat paramagnetické ionty kovů v komplexech vykazujících vysokou kinetickou inertnost a termodynamickou stabilitu. Jejich komplexy jsou pro své vhodné vlastnosti využívány v medicíně. Tato práce se věnuje ligandu *cis*-DO2A2P, který patří do série ligandů s cyklenovým skeletem a smíšenými acetátovými a fosfonátovými pendantními rameny. Na rozdíl od ostatních ligandů dané série, jejichž studiu už byla věnována značná pozornost, informace o vlastnostech ligandu *cis*-DO2A2P stále chybí. V rámci této práce byly studovány komplexační vlastnosti zmíněného ligandu a následně vlastnosti jeho komplexů s ionty lanthanoidové série v roztoku.

Klíčová slova

Makrocykly; polydentátní ligandy; lanthanoidy; přechodné kovy; organofosforové kyseliny

Abstract

Macrocyclic ligands are compounds well-known and studied for their ability to bind metal ions into complexes possessing high kinetic inertness and thermodynamic stability. These properties make such compounds useful in medicine. This thesis focuses on ligand *cis*-DO2A2P, which belongs to a series of ligands based on cyclen skeleton with mixed acetate and phosphonate pendant arms. A lot of attention has been paid to the other members of this ligands series, but the information about *cis*-DO2A2P is still incomplete. In this thesis, the complexation properties of mentioned ligand were studied, as well as properties of its complexes with the lanthanide ions in solution.

Key words

Macrocycles; polydentate ligands; lanthanides; transition metals; organophosphorus acids

Obsah

1	Teoretický úvod	7
1.1	Makrocyclické ligandy	7
1.2	Polyazamakrocyclické ligandy	8
1.2.1	DOTA a od nej odvodené ligandy	9
1.2.2	Izoméria DOTA-like ligandov v roztoku	11
1.3	Porovnanie vlastností DOTA-like ligandov a ich komplexov	13
1.4	NMR štúdium komplexov paramagnetických iónov kovov	15
1.4.1	NMR relaxačné procesy	15
1.4.2	„Lanthanide induced shift“ (LIS) a „Lanthanide induced relaxation“ (LIR)	16
1.5	Využitie makrocyclických ligandov v medicíne	18
1.5.1	Použitie v MRI	18
2	Cieľ práce	20
3	Experimentálna časť	21
3.1	Použité chemikálie	21
3.2	Experimentálne metódy	21
3.2.1	Chromatografia na tenkej vrstve (TLC)	21
3.2.2	Nukleárna magnetická rezonancia (NMR)	21
3.2.3	Hmotnostná spektrometria (MS)	22
3.2.4	Potenciometria	23
3.2.5	UV-Vis spektroskopia	25
3.3	Syntetická časť	26
3.3.1	Príprava 1,4-bis(<i>terc</i> -butoxykarbonylmetyl)cyclénu (1)	27
3.3.2	Príprava 7,10-bis(<i>terc</i> -butoxykarbonylmetyl)-1,4-bis(dietylfosfonometyl)-cyclénu (2)	28
3.3.3	Spôsoby prípravy deesterifikovaných látok (3) a (4)	29
3.3.4	Bázická hydrolýza látky (2) alkalickým hydroxidom – príprava látky (3)	29
3.3.5	Použitie $Ba(OH)_2$ – príprava látky (3)	30
3.3.6	Priama kyslá hydrolýza (2) – príprava látky (4)	31
3.3.7	Deesterifikácia použitím TMSBr – príprava látky (3b)	31
3.3.8	Reakcia Mannichovho typu s H_3PO_3 – príprava látky (4)	32
3.3.9	Fosfinátový analóg – príprava látky (2b)	32
3.3.10	Príprava tri- <i>terc</i> -butyl fosfitu ako činidla pre Mannichovu reakciu	33
3.3.11	Použitie $P(t-BuO)_3$	34

3.3.12	Príprava 1,4-karbonylmetyl-cyklénu (1a)	34
3.3.13	Príprava 1,4-bis-benzyl-cyklénu (1b)	35
3.3.14	Súhrnná schéma pôvodnej syntézy H_6L	37
3.3.15	Príprava komplexov $Ln-L$	38
4	Výsledky a diskusia	39
4.1	Vyskúšané syntetické cesty prípravy H_6L	39
4.2	Potenciometrické štúdie H_6L	42
4.2.1	Stanovenie disociačných konštánt H_6L	42
4.2.2	Interakcie H_6L s vybranými iónmi Ln^{3+}	44
4.2.3	Interakcie H_6L s vybranými iónmi prechodných kovov	46
4.3	NMR štúdie komplexov $Ln-L$	50
4.3.1	Meranie T_1 a T_2^* relaxačných časov komplexov $Ln-L$	51
4.4	UV-Vis štúdium kinetiky disociácie komplexu $Ce-L$	53
5	Záver	56
6	Príloha	57
7	Zoznam použitých skratiek	61
8	Zoznam použitej literatúry	62

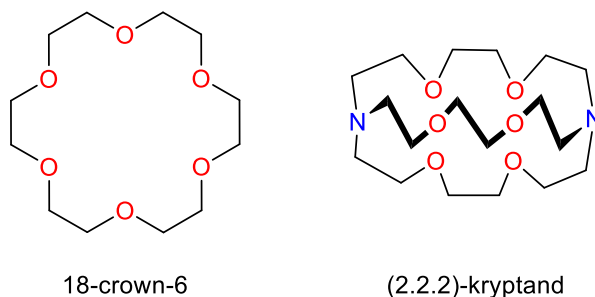
1 Teoretický úvod

1.1 Makrocyclické ligandy

Makrocyclické ligandy sú definované ako cyklické látky skladajúce sa z deviatich a viacerých (hetero)atómov, obsahujúce vo svojom skelete minimálne tri donorové atómy.^[1] Od druhej polovice 20. storočia je syntéze takýchto látok a následnému štúdiu ich koordinačných vlastností venovaná významná pozornosť. Boli syntetizované mnohé makrocikly obsahujúce ako donorové atómy napr. atómy dusíku, kyslíku, síry a i., alebo ich kombinácie.

Makrocyclické ligandy sú schopné vytvárať komplexy so širokou škálou kovových iónov. V závislosti na počte atómov kruhu (veľkosti vytvorenej kavity) a druhu heteroatómov je možné ovplyvňovať selektivitu daného ligandu pre ióny rôznych kovov. Vďaka preorganizovanej štruktúre makrocyclického ligandu sú ním kovové ióny pri komplexácii efektívne „obalené“, čo vedie k vzniku komplexov vyznačujúcich sa vysokou kinetickou inertnosťou a termodynamickou stabilitou. Výrazný nárast konštánt stability komplexov makrocyclických ligandov oproti komplexom obsahujúcim acyklické ligandy je označovaný ako *makrocyclický efekt*.^[2] Vďaka týmto vlastnostiam nachádzajú makrocyclické ligandy a ich komplexy významné uplatnenie v oblasti medicíny (1.3).

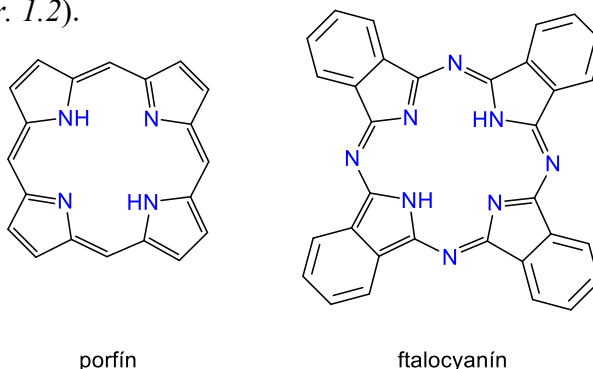
Medzi najznámejších zástupcov makrocyclických ligandov patria crown-étery, kryptandy (Obr. 1.1) a polyazamakrocikly (kap. 1.2).



Obrázok 1.1 – príklady makrocyclických ligandov

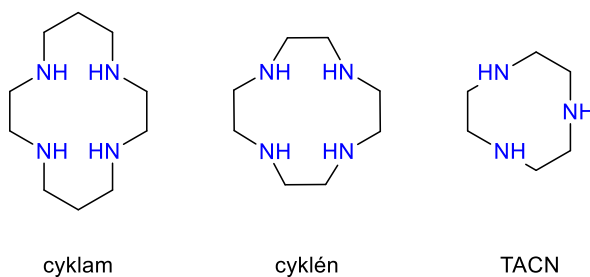
1.2 Polyazamakrocyclické ligandy

Polyazamakrocyclické ligandy sú ligandy obsahujúce v kruhu rôzny počet donorových atómov dusíku. Štruktúrny motív polyazamakrocyclických je mimoriadne rozšírený v prírodných látkach, nachádzame ho napr. v skelete porfyrínov alebo ftalocyaníne (Obr. 1.2).



Obrázok 1.2 – príklady makrocyclických ligandov v prírodných látkach

Najznámejšími a obsiahlo študovanými synteticky pripravenými zástupcami tejto skupiny sú dva cyklické tetraamíny cyklam a cyklén a triamín TACN (Obr. 1.3). Uvedené ligandy je možné modifikovať prostredníctvom zavádzania rôznych funkčných skupín na makrocyclické atómy dusíku. Podľa chemickej povahy zavádzaných funkčných skupín, nazývaných pendantné ramená, je možné ďalej zlepšovať komplexačné vlastnosti ligandov. Každý z týchto troch ligandov obsahuje kavitu iných rozmerov, a teda tieto ligandy vykazujú voči rôznym kovovým iónom rôznu selektivitu. Cyklam a jeho deriváty sú veľmi vhodné pre komplexáciu dvojmocnej medi, niklu či kobaltu. Látky odvodené od TACN-u efektívne komplexujú menšie ióny, napr. trojmocné gálium. Látky obsahujúce cyklénový skelet sa osvedčili ako vhodné ligandy pre komplexáciu trojmocných iónov prvkov skupiny lantanoidov.



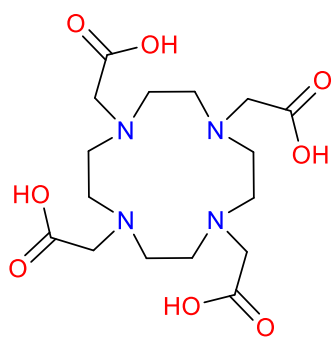
Obrázok 1.3 – najznámejšie makrocyclické ligandy obsahujúce donorové atómy dusíku

1.2.1 DOTA a od nej odvodené ligandy

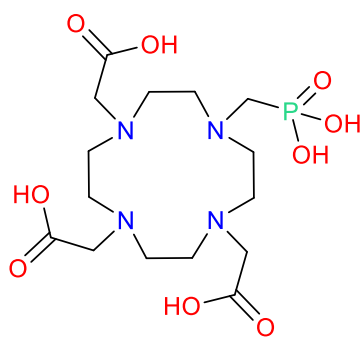
Cyklén (1,4,7,10-tetraazacyklododekán) je makrocyclický ligand tvorený 12-členným kruhom obsahujúcim 4 atómy dusíku (*Obr. 1.3*). Atómy dusíku makrocyklu môžu byť ďalej modifikované zavádzaním pendentných ramien obsahujúcich rôzne funkčné skupiny.

Najznámejším derivátom cyklénu je tzv. DOTA – cyklén symetricky substituovaný na všetkých štyroch atómoch dusíku acetátovými pendentnými ramenami (*Obr. 1.4*). Acetátové skupiny sú schopné odštepovať protón, čím tvoria štyri nové koordinačné miesta, DOTA je teda oktaedentátnym ligandom. Trojmocné ióny lantanoidov preferujú koordinačné čísla 8 a 9. Vzhľadom na to, že v oxidačnom stave 3+ majú vysokú povrchovú hustotu náboja (a teda sú tvrdými Lewisovými kyselinami), k tvrdým atómom kyslíka a stredne tvrdým atómom dusíka DOTA sa koordinujú veľmi efektívne. Väčšie ióny Ln^{3+} zo začiatku lantanoidovej série uprednostňujú koordinačné číslo 9. Deviate koordinačné miesto býva často v ich komplexoch obsadené molekulou vody koordinovanou priamo na centrálny ión.

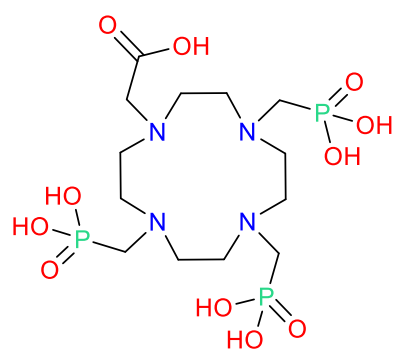
Modifikáciami štruktúrneho vzoru DOTA boli syntetizované mnohé ligandy (tzv. **DOTA-like** ligandy), ktoré majú jedno alebo viacero acetátových pendentných ramien substituované inými funkčnými skupinami (napr. alkoholy, amidy, fosfináty/fosfonáty a i.).^{[3],[4]} Bolo zistené, že prítomnosť pendentného ramena obsahujúceho fosfor vedie k ligandom s vyššou komplexačnou selektivitou, ale so zachovaním dostatočnej termodynamickej stability.^[3] Práve toto viedlo k postupnému studiu série DOTA-like zlúčenín s rôznymi pomermi acetátových a fosfonátových pendentných ramien. Táto séria je zobrazená na *Obr. 1.4*.



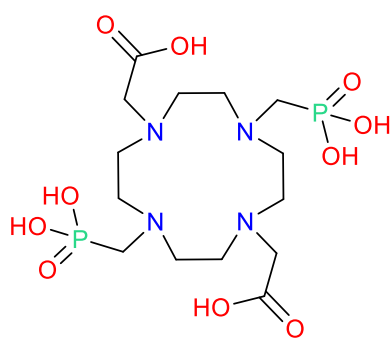
DOTA



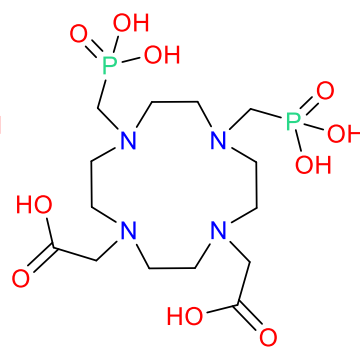
DO3AP



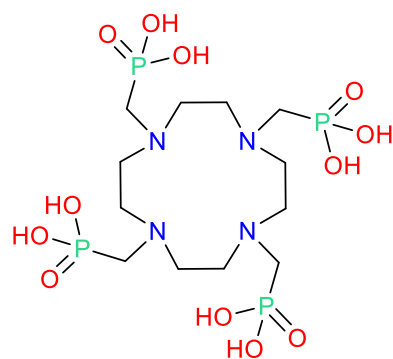
DOA3P



trans-DO2A2P



cis-DO2A2P

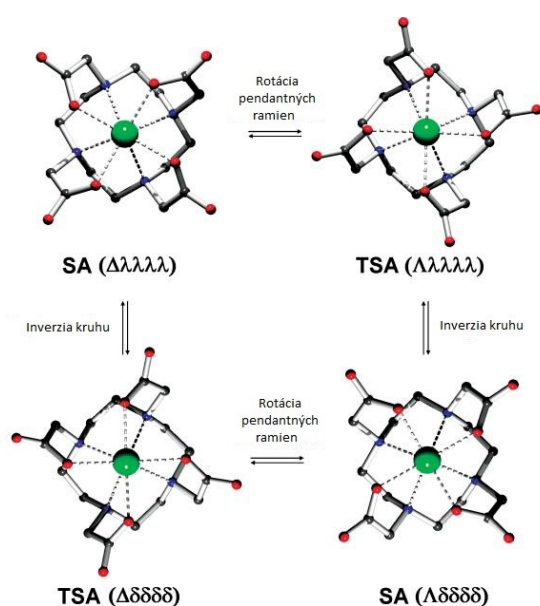


DOTP

Obrázok 1.4 – séria ligandov odvodených od DOTA s rôznymi pomermi acetátových a fosfonátových pendantných ramien

1.2.2 Izoméria DOTA-like ligandov v roztoku

Komplexy ligandov štruktúrneho typu DOTA s iónmi lantanoidovej série môžu v roztoku existovať v dvoch diastereoizomérnych formách. Izomériu spôsobujú dva vzájomne nezávislé zdroje chiralít. Prvým je možnosť rôznej orientácie koordinujúcich skupín pendantných ramien (Δ alebo Λ), druhým je konformácia päťčlenných kruhov tvorených koordináciou etyléndiamínových fragmentov na atóm kovu (označovaná ako δ alebo λ). Kvôli snahe minimalizovať vnútorné pnutie majú všetky tieto štyri kruhy rovnakú konformáciu, t. j. $\delta\delta\delta\delta$ alebo $\lambda\lambda\lambda\lambda$. Komplexy ligandov typu DOTA môžu tvoriť dokopy štyri izoméry – dve diastereoizoméne dvojice enantiomérov ($\Delta\delta\delta\delta/\Lambda\lambda\lambda\lambda$ a $\Delta\lambda\lambda\lambda/\Lambda\delta\delta\delta$). Enantiomérny pár $\Delta\lambda\lambda\lambda/\Lambda\delta\delta\delta$ je označovaný ako SA („Square Antiprism“), pár $\Delta\delta\delta\delta/\Lambda\lambda\lambda\lambda$ je označovaný ako TSA („Twisted-Square Antiprism“). Izoméria je zobrazená na Obr. 1.5. Atómy dusíkov makrocyclu a koordinované atómy kyslíkov pendantných ramien tvoria v komplexe dve vzájomne



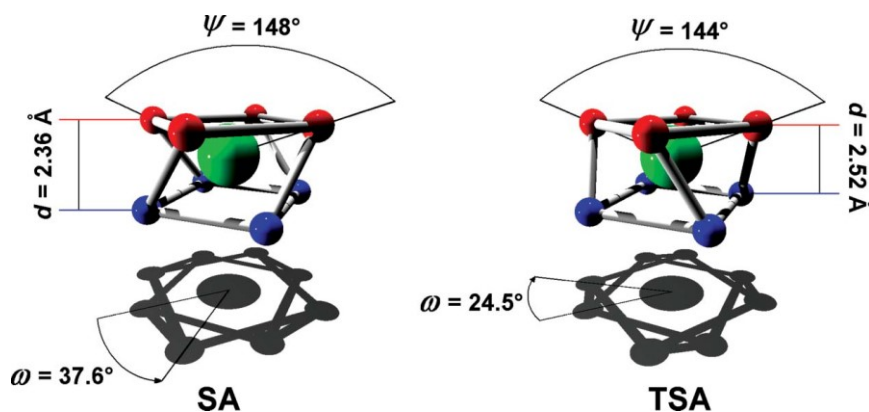
Obrázok 1.5 – možné izoméry komplexov ligandov založených na štruktúrnom motíve DOTA s iónmi Ln^{3+} (obrázok prevzatý z literatúry^[6])

paralelné roviny – N_4 a O_4 . Rovina O_4 býva v prípade väčších iónov lantanoidov uzavretá priamo na centrálny atóm koordinovanou molekulou vody. Pokiaľ molekula vody na centrálny atóm nie je priamo koordinovaná, označuje sa táto skutočnosť apostroфом – t. j. izoméry sú označované SA' a TSA' . Diastereoizoméry sú pri laboratórnej teplote v pomalej výmene, sú teda pozorovateľné v NMR spektrách komplexov.^[5]

Izoméry SA a TSA sa líšia predovšetkým torzným uhlom ω medzi rovinami N_4 a O_4 . Pre izomér SA sa uhol ω blíži teoretickej hodnote 45° , pre izomér TSA je hodnota uhlu ω blízka teoretickej hodnote $22,5^\circ$. Izoméry komplexov $[\text{Pr}(\text{H}_2\text{O})(\text{DOTA})]^-$ (SA) a $[\text{Ce}(\text{H}_2\text{O})(\text{DOTA})]^-$ (TSA) sú znázornené na Obr. 1.6.

Ďalším dôležitým faktorom charakterizujúcim tieto komplexy je uhol ψ , tzv. „opening angle“. Je to uhol, ktorý medzi sebou zvierajú atóm kovu a dva protiľahlé atómy kyslíku pendantných ramien (*Obr. 1.6*). Veľkosť tohto uhla predurčuje pravdepodobnosť koordinácie molekuly vody v prvej koordinačnej sfére (koordinovanej priamo na centrálny atóm). Molekula vody je priamo koordinovaná v prípade, že veľkosť uhlu ψ neklesne pod $\sim 135^\circ$.^{[3],[6]}

Dôležitým parametrom je tiež veľkosť kavity – t. j. vzdialenosť rovín N_4 a O_4 , označovaná ako d (*Obr. 1.6*). Ľahšie, väčšie ióny lantanoidov vyžadujú väčšiu kavitu, vzdialenosť rovín pre komplexy La^{3+} a Ce^{3+} je 2,5 Å a v komplexoch je preferovaná formácia TSA izoméru^{[5],[7],[8]}. S postupným zmenšovaním iónových polomerov naprieč lantanoidovou sériou sa centrálny atóm a celá rovina O_4 posúva bližšie k rovine N_4 , vzdialenosť rovín sa znižuje a štruktúra sa mení na SA izomér so vzdialenosťou rovín 2,3 – 2,4 Å.^[6]

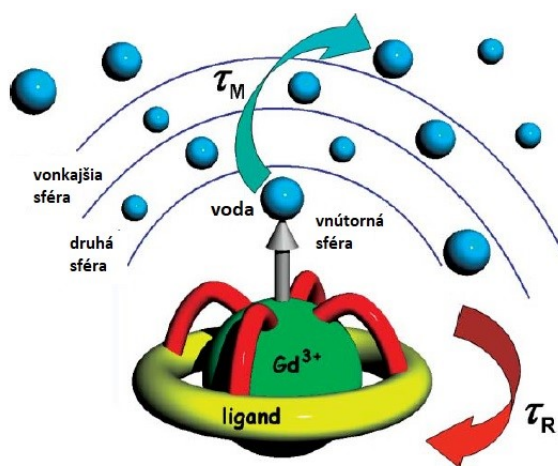


Obrázok 1.6 – koordinačné mnohosteny pre usporiadanie komplexov; parametre sú definované pre komplexy $[Pr(H_2O)(DOTA)]^-$ (SA) a $[Ce(H_2O)(DOTA)]^-$ (TSA). Molekuly vody sú pre prehľadnosť vynechané. (Obrázok prevzatý z literatúry^[6])

1.3 Porovnanie vlastností DOTA-like ligandov a ich komplexov

Komplexy ligandu DOTA vykazujú pozdĺž lantanoidovej série rôzny pomer izomérov SA/TSA v roztoku. Naopak, komplexy ligandov obsahujúcich fosfonátové (DOTP) alebo fosfinátové (DOTP^R) pendantné ramená s iónmi lantanoidov vykazujú exkluzívne usporiadanie TSA.^{[3],[9]–[11]} Táto skutočnosť je spôsobená prítomnosťou objemného atómu fosforu v jednom alebo viacerých pendantných ramenách.

Rozdiely nastávajú aj v koordinácii molekuly vody na deviatom koordinačnom mieste. V komplexoch DOTA s iónmi lantanoidov bola molekula vody pozorovaná u všetkých iónov Ln³⁺, okrem TSA izomérov najmenších iónov – Yb³⁺ a Lu³⁺, ktoré nemajú molekulu vody v prvej koordinačnej sfére.^[5] Komplexy iónov Ln³⁺ s ligandom DOTP majú naopak molekulu vody koordinovanú len v prípade najväčších iónov, t. j. Ce³⁺, Pr³⁺ a Nd³⁺.^[10] V komplexoch ligandov obsahujúcich atóm fosforu však naberá na význame hydratacia druhej sféry (Obr. 1.7). V tomto prípade sa jedná o molekuly vody, ktoré sú udržiavané v blízkosti centrálného iónu vodíkovými väzbami s organickým ligandom.^[12] Ich príspevok môže zvýšiť celkovú relaxivitu o 5–15 % v závislosti na štruktúre komplexu. Napr. komplex [Gd(DOTP)] má usporiadanie TSA,^[9] no jeho relaxivita je podobná komplexu [Gd(DOTA)(H₂O)][–], práve vďaka príspevku usporiadaných molekúl vody v druhej koordinačnej sfére.^[13]



Obr. 1.7 – Model kontrastnej látky založenej na ióne Gd³⁺ v roztoku
(obrázok prevzatý z literatúry^[6])

Molekula vody v prvej koordinačnej sfére je nevyhnutnou súčasťou komplexov pre aplikácie ako MRI kontrastné látky, komplexy ligandu DOTP preto v tejto oblasti nenašli využitie. Zároveň ale bolo zistené, že TSA izomér vymieňa koordinovanú vodu omnoho rýchlejšie ako SA izomér, a teda má vyššiu relaxivitu.^{[8],[14]} Bola preto vyvinutá snaha kombinovať pozitívne vlastnosti ligandov DOTA a DOTP v ligandoch substituovaných rôznymi pomermi acetátových a fosfonátových pendantných ramien, ktoré by sa vyskytovali primárne v TSA usporiadaní, no zároveň by niesli molekulu vody koordinovanú v prvej koordinačnej sfére. Výhodnou vlastnosťou prevzatou od tetra-fosforových ligandov by bola tiež usporiadanosť druhej koordinačnej sféry.

Ligand **DO3AP** a jeho komplexy s iónmi lantanoidov vykazujú podobné vlastnosti ako komplexy ligandu DOTA^{[15],[16]} – nonakoordinácia veľkých iónov Ln^{3+} (La^{3+} – Gd^{3+}) s priamo koordinovanou molekulou vody.^[15] V roztoku sa komplexy tohto ligandu nachádzajú vo forme oboch izomérov, s prítomnosťou atómu fosforu ale rastie relatívne zastúpenie izoméru TSA (TSA').

Pre ligand **DOA3P** nebola vykonaná štúdia izomérie komplexov celej lantanoidovej série, vzhľadom na počet fosfonátových pendantných ramien však možno predpokladať podobné vlastnosti ako u komplexov ligandu DOTP. Výskum ligandu DOA3P sa venoval hlavne termodynamickým a kinetickým vlastnostiam.^{[17],[18]}

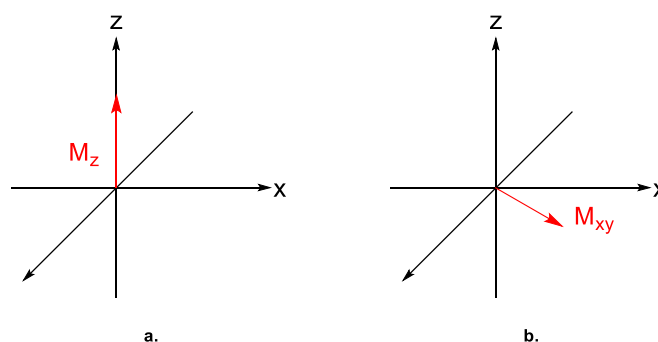
Ligand **trans-DO2A2P** a vlastnosti jeho komplexov boli tiež študované.^{[19],[20]} Vlastnosti tohto ligandu a jeho komplexov zapadajú podľa očakávaní do série medzi DOTA a DOTP. Komplexy iónov lantanoidov s týmto ligandom vykazujú pozdĺž série prevažne TSA usporiadanie. SA usporiadanie bolo pozorované v malom zastúpení (7 %) v NMR spektrách komplexu [EuDO2A2P] meraných pri zníženej teplote (0 °C). Rezonancie izomérov sú pri 25 °C v koalescencii.^[19]

1.4 NMR štúdium komplexov paramagnetických iónov kovov

1.4.1 NMR relaxačné procesy

Po vychýlení vektoru magnetizácie vplyvom elektromagnetického pulzu má tento vektor tendenciu vrátiť sa do pôvodného stavu. Procesy, ktorými sa návrat uskutočňuje, sa nazývajú relaxačné procesy, alebo **relaxácia**. Rozlišujeme dva typy relaxácie, a to longitudinálnu (spin-mriežkovú) a transverzálnu (spin-spinovú).

- a. **Longitudinálna relaxácia** – je charakterizovaná relaxačným časom T_1 , súvisí s postupným nárastom magnetizácie v ose z (Obr. 1.8a). Je spôsobená interakciou spinového systému s okolím.
- b. **Transverzálna relaxácia** – je charakterizovaná relaxačným časom T_2 , súvisí s úbytkom vektoru magnetizácie v rovine xy (Obr. 1.8b). Je spôsobená spin-spinovými interakciami vnútri vzorky. Avšak, v reálnych NMR experimentoch transverzálna magnetizácia slabne rýchlejšie, ako by bolo očakávané – tento čas sa označuje T_2^* . Relaxačný čas T_2^* je považovaný za „pozorovaný“ čas T_2 , a je dôsledkom nehomogenít magnetického poľa. Jeho hodnota je vždy menšia ako hodnota T_2 . Relaxačný čas T_2^* môže byť vypočítaný z pološírky signálu ako $T_2^* = 1/\pi\nu_{1/2}$.



Obrázok 1.8 – NMR relaxačné procesy: longitudinálna relaxácia (a.); transverzálna relaxácia (b.)

1.4.2 „Lanthanide induced shift“ (LIS) a „Lanthanide induced relaxation“ (LIR)

Elektrónová konfigurácia iónov Ln^{3+} je $[\text{Xe}]4f^n$, kde $n = 0-14$. Trivalentné ióny lantánu a lutécia nemajú žiadne nespárované elektróny, sú preto diamagnetické. Zvyšné prvky lantanoidovej série v oxidačnom čísle $3+$ majú 1 až 7 nespárovaných $4f$ elektrónov, z čoho vyplývajú ich paramagnetické vlastnosti. Koordinácia paramagnetických Ln^{3+} iónov vedie obecné k rozsiahlym posunom NMR frekvencií jadier ligandu, ktoré sa nachádzajú v blízkosti paramagnetického centrálneho atómu.^[21] Tieto posuny výrazne závisia na povahe lantanoidového iónu a relatívnej vzdialenosti pozorovaného jadra od centrálneho atómu. Aj napriek tomu, že lantanoidové ióny sú chemicky veľmi podobné kvôli tieneniu $4f$ elektrónov, každý z nich má charakteristické účinky na NMR posuny jadier vo svojej blízkosti. Posuny vyvolané prítomnosťou iónu Ln^{3+} sú citlivé na štruktúrne zmeny – vďaka tomu môžu byť lantanoidové komplexy použité napr. na určenie molekulárnej konformácie, rozlíšenie enantiomérov či zistenie počtu koordinovaných molekúl vody.^[22]

1.4.2.1 Separácia kontaktných a pseudo-kontaktných príspevkov k LIS

Pre každé pozorované jadro i (i je ^1H alebo ^{31}P) v paramagnetických komplexoch sa lantanoidmi indukovaný chemický posun skladá z troch príspevkov^[21], a to:

$$\text{LIS}_i = \Delta_i^d + \Delta_i^k + \Delta_i^{\text{pk}} \quad (1)$$

kde Δ_i^d je diamagnetický príspevok (výsledok konformačných zmien a indukčných efektov), Δ_i^k je kontaktný a Δ_i^{pk} pseudo-kontaktný príspevok. Po odčítaní diamagnetického príspevku môže byť pre každé jadro i v paramagnetickom komplexe Ln^{3+} vyjadrený paramagnetický príspevok k LIS_i ako:

$$\text{LIS}_i = \Delta_i^k + \Delta_i^{\text{pk}} = \langle S_z \rangle_j F_i + C_j^D G_i \quad (2)$$

kde kontaktný príspevok (Δ_i^k) vychádza z prenosu hustoty nespárovaných spinov Ln^{3+} cez väzby na ligandy a pseudo-kontaktný (dipolárny, Δ_i^{pk}) príspevok vzniká dipolárnou interakciou medzi magnetickými momentmi nespárovaných elektrónov iónov Ln^{3+} a jadrom ligandu v priestore. $\langle S_z \rangle_j$ je hodnota očakávaného spinu, C_j^D je magnetická

konštanta Ln^{3+} iónu – parametre sú charakteristické pre jednotlivé lantanoidové ióny^[21]. Parametre F_i a G_i sú parametrami ligandu, nezávislé na druhu Ln^{3+} iónu.

Kontaktný a pseudo-kontaktný príspevok môžu byť oddelené štruktúrne-nezávislou metódou po rozdelení rovnice (2) na dve lineárne formy:

$$\text{LIS}_i / \langle S_z \rangle_j = F_i + (C_j^D / \langle S_z \rangle_j) G_i \quad (3)$$

$$\text{LIS}_i / C_j^D = (\langle S_z \rangle_j / C_j^D) F_i + G_i \quad (4)$$

Pokiaľ je séria lantanoidových komplexov izoštruktúrna, hodnoty parametrov F_i a G_i môžu byť určené ako smernica a priesečník v grafe podľa rovnice (3) a *vice versa* v grafe podľa rovnice (4). Rovnica (3) sa používa na študovanie jadier s prevažne pseudo-kontaktným príspevkom (napr. atómy ^{31}P relatívne vzdialené od iónu Ln^{3+}), rovnica (4) je využívaná na skúmanie jadier s kontaktným príspevkom, napr. jadier atómov ^{17}O v molekule vody priamo koordinovanej na centrálny ión Ln^{3+} .

Ak nastanú mierne zmeny v orientácii ligandu vzhľadom k iónu Ln^{3+} , zmena je reflektovaná v malých zmenách hodnoty parametru G . Tieto zmeny ale neovplyvňujú hodnotu parametra F , t. j. grafy podľa rovnice (4) sú naďalej lineárne. Pokiaľ ale v sérii komplexov nastane výrazná štruktúrna zmena (napr. zmena koordinačného módu ligandu), ani jedna z hodnôt F a G nie je konštantná, oba grafy sú nelineárne a ukazujú zlom.^[23] Zlom bol pozorovaný v mnohých prípadoch medzi skupinou ľahkých (Ce^{3+} - Gd^{3+}) a ťažkých (Tb^{3+} - Yb^{3+}) lantanoidových iónov – môže značiť zmenu izomérie alebo zmenu hydratácie komplexu.^{[24],[25]}

Koordinácia paramagnetického iónu Ln^{3+} tiež zvyšuje rýchlosť relaxácie (LIR z angl. „Lanthanide Induced Relaxation rate“), skracuje teda dĺžku longitudinálnych (T_1) a transversálnych (T_2) relaxačných časov jednotlivých jadier. Na základe takto získaných relaxačných časov je potom možné pomocou experimentálnych rovníc vypočítať vzdialenosť medzi meraným jadrom atómu ligandu a centrálnym atómom.^{[21],[22]}

Pokiaľ molekula ligandu obsahuje jeden či viac atómov fosforu, je výhodné merať T_1 relaxačné časy pomocou ^{31}P NMR, z hľadiska menšieho počtu signálov v spektre oproti ^1H meraniam, a teda jeho výraznému zjednodušeniu.

1.5 Využitie makrocyclických ligandov v medicíne

Spomenuté makrocyclické ligandy nachádzajú vďaka svojim vlastnostiam – t. j. vysokej kinetickej inertnosti a termodynamickej stabilite svojich komplexov využitie v oblasti medicíny. Používajú sa ako komplexačné činidlá rádionuklidov pre zobrazovanie a terapiu v nukleárnej medicíne či ako kontrastné látky pre zobrazovanie magnetickou rezonanciou (MRI – z angl. „Magnetic Resonance Imaging“).

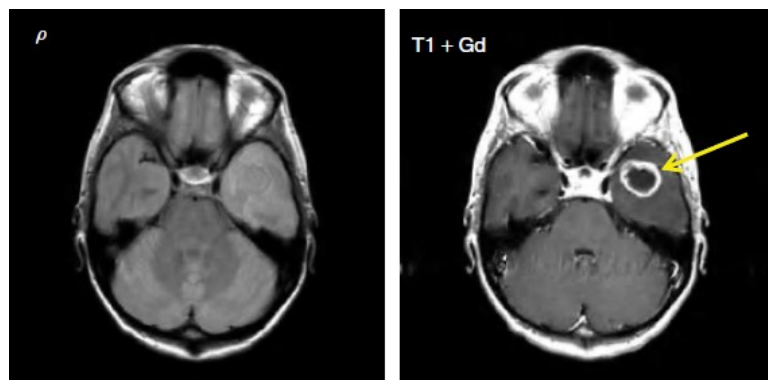
1.5.1 Použitie v MRI

Zobrazovanie magnetickou rezonanciou je rozšírená diagnostická metóda, ktorá neinvazívne zobrazuje mäkké tkanivá. Funguje na princípe ^1H NMR. Meranými jadrami sú jadrá atómov vodíku viazaných v molekulách vody, ktorá tvorí značnú časť ľudského tela. Hlavnou výhodou tejto metódy je kontrast, ktorý vzniká rozdielom medzi zdravou a patologicky poškodenou časťou zobrazovaného tkaniva (natívne zobrazenie bez použitia kontrastnej látky).

V niektorých prípadoch ale z natívneho scanu nie je možné určiť diagnózu – vtedy sa pristupuje k použitiu intravenózne podávaných kontrastných látok, ktoré daný kontrast ďalej zvyšujú.

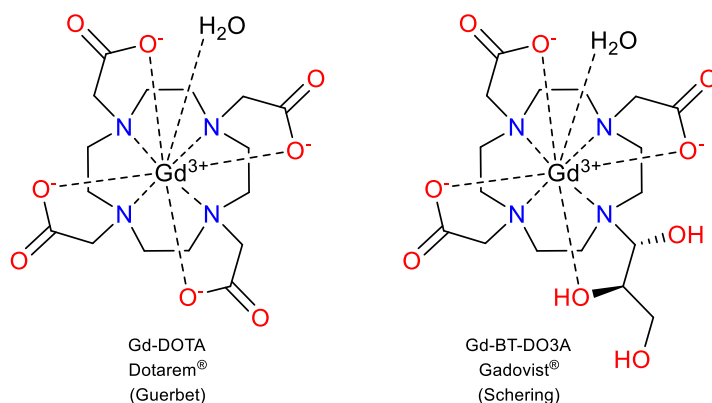
Z fyzikálneho hľadiska rozdeľujeme MRI kontrastné látky na dve skupiny:

1. **Skupina T_1 kontrastných látok** (paramagnetické) – indukujú pozitívny kontrast skracovaním relaxačného času T_1 meraných ^1H jadier (*Obr. 1.9*). Do tejto skupiny sa zaraďujú komplexy paramagnetických iónov kovov (Fe^{3+} , Mn^{2+} , Gd^{3+}).
2. **Skupina T_2 kontrastných látok** (superparamagnetické) – indukujúce negatívny kontrast skracovaním relaxačného času T_2 protónových jadier. Jedná sa koncepčne o mikrokryštalické nanočastice oxidov železa (MION) nazývané tiež malé superparamagnetické oxidy železa (SPIO).



Obrázok 1.9 – zobrazenie mozgu s nádorom: natívne zobrazenie (vľavo) a zobrazenie s použitím kontrastnej látky (vpravo) (Obrázok prevzatý z literatúry)^[42]

Ako T_1 kontrastné látky sa používajú inertné komplexy paramagnetických iónov kovov, v súčasnej medicínskej praxi najmä trojmocného gadolína. To je ale vo forme voľného aquaiónu mimoriadne toxické, preto je nutná jeho koordinácia v komplexe výrazne kineticky inertnom a termodynamicky stabilnom. Keďže sa v tele nachádzajú endogénne kovové ióny (napr. Ca^{2+} , Zn^{2+}), daný komplex musí vykazovať vyššiu selektivitu pre ión Gd^{3+} , aby nedošlo k uvoľneniu kovového iónu v tele. Niektoré súčasne používané kontrastné látky na báze gadolína (Dotarem, Gadovist) sú založené práve na makrocyclických ligandoch typu DOTA (Obr. 1.10).



Obrázok 1.10 – príklady MRI kontrastných látok založených na makrocyclických ligandoch

Gadolinitý ión má v týchto komplexoch koordinačné číslo 9, t. j. obsahuje molekulu vody koordinovanú v prvej koordinačnej sfére. Prítomnosť tejto molekuly vody je esenciálna pre mechanizmus zvyšovania kontrastu, pretože jej vymieňaním je magnetická informácia odovzdávaná okolitej vode.^[6]

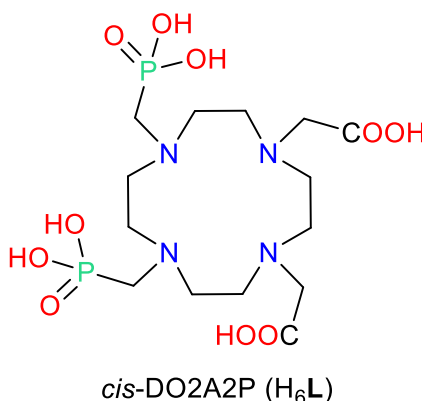
2 Cieľ práce

Ako už bolo spomenuté vyššie, makrocyclické ligandy založené na štruktúrnom vzore DOTA sú veľmi dobrými komplexačnými činidlami pre trojmocné ióny lantanoidov, s ktorými tvoria komplexy vykazujúce vysokú kinetickú inertnosť a termodynamickú stabilitu. Zavádzaním pendantných ramien obsahujúcich fosfor sa zlepšujú niektoré vlastnosti týchto ligandov (napr. rastie komplexačná selektivita). Komplexy s ligandom DOTP však nie sú schopné viazať molekulu vody v prvej koordinačnej sfére, bola preto venovaná významná snaha výskumu ligandov s menším počtom fosfonátových pendantných ramien.

Ligandom DO3AP, DOA3P a *trans*-DO2A2P (Obr. 1.4), ich komplexom a štúdiu ich vlastností sa venovalo už niekoľko publikácií.^{[15]–[17],[20]} Poslednému členovi série, t. j. ligandu *cis*-DO2A2P (Obr. 2.1), sa ale takejto pozornosti zatiaľ nedostalo. Táto práca si berie za úlohu túto medzeru doplniť.

Cieľom tejto práce bolo:

- príprava makrocyclického ligandu *cis*-DO2A2P (H_6L) optimalizovaným postupom,
- príprava komplexov ligandu *cis*-DO2A2P s iónmi lantanoidovej série,
- štúdium vlastností týchto komplexov v roztoku,
- štúdium komplexačných vlastností ligandu *cis*-DO2A2P.



Obrázok 2.1 – ligand študovaný v tejto diplomovej práci

3 Experimentálna časť

3.1 Použité chemikálie

Základnou chemikáliou použitou pre syntézu navrhnutého ligandu bol komerčný pevný cyklén (1,4,7,10-tetraazacyklododekán, CheMaTech). Ďalšie použité chemikálie sú tiež komerčne dostupné od firiem Sigma-Aldrich, Fluka, Penta, Lach-ner. Chloroform bol sušený nad P_2O_5 a následne predestilovaný. Éter bol sušený kovovým sodíkom a následne predestilovaný. Ostatné použité komerčné rozpúšťadlá neboli sušené ani inak čistené.

3.2 Experimentálne metódy

3.2.1 Chromatografia na tenkej vrstve (TLC)

Tenkovrstvová chromatografia bola vykonávaná na doštičkách TLC Silica gel 60 F₂₅₄ a TLC Aluminium oxid 60 F₂₅₄ (Merck). Na vizualizáciu bola použitá UV lampa (vlnová dĺžka 254 nm), 5% roztok modrej skalice vo vode, Dragendorffov roztok, 0,5% roztok ninhydrínu v etanole alebo pary I_2 .

3.2.2 Nukleárna magnetická rezonancia (NMR)

Pre bežné experimenty vykonávané v priebehu syntetickej práce boli používané NMR spektrometre Varian VNMRs300, Bruker Ascend 400 a Bruker AVANCE-III 600 vybavený kryosondou, všetky dostupné na chemickom ústave PĽF. Na týchto spektrometroch boli merané štandardné experimenty s jadrami 1H , ^{13}C a ^{31}P . Rezonančné frekvencie jadier pre uvedené prístroje sú uvedené v *Tab. 3.1*. Vzorky boli merané v kyvetách o vnútornom priemere 5 mm. Ako vnútorný štandard bol používaný TMS (meranie v $CDCl_3$) alebo *t*-BuOH (meranie v 99,8% D_2O). Pri meraní spektier ^{31}P a $^{31}P\{^1H\}$ bola nezávisle na používanom rozpúšťadle použitá ako štandard 85% H_3PO_4 (0 ppm) alebo 3% roztok H_3PO_4 v D_2O v inertnej kyvete (0,52 ppm). Spektrá boli následne spracované v programe MestReNova.

Tabuľka 3.1 – rezonančné frekvencie meraných jadier na používaných spektrometroch

Merané jadro	Frekvencia spektrometra/MHz	Rezonančná frekvencia jadra/MHz
^1H	300	300,0
	400	400,0
	600	600,0
^{13}C	300	75,44
	400	100,6
^{31}P	300	121,4
	400	161,9

3.2.2.1 Meranie T_1 relaxačných časov

Relaxačné experimenty pre zistenie relaxačného času T_1 jadier ^{31}P boli merané na spektrometri Varian VNMR300 pri konštantnej teplote 25 °C použitím experimentu typu „*Inversion recovery*“. Pre každé meranie bol kalibrovaný pulz. Dáta boli následne spracované v programe VNMRJ a MestReNova.

3.2.2.2 NMR titrácia

Ako doplnková metóda k potenciometrii pre silne zásaditú oblasť pH (pH ~12–14) bola použitá NMR titrácia ligandu. ^1H NMR titrácia bola vykonávaná na stroji Bruker AVANCE-III 600 vybavenom kryosondou, ^{31}P NMR titrácia na stroji Varian VNMR300. Titrácia obsahovala 15 bodov o známej koncentrácii H^+ vopred namiešaných zo zásobných roztokov používaných na potenciometrické titrácie. Pre vzorky v silne zásaditej oblasti pH bol použitý roztok $(\text{NMe}_4)\text{OH}$ o koncentrácii ~1 M. Ako externý štandard bola použitá inertná kyveta naplnená D_2O s prídavkom $t\text{-BuOH}$. Dáta získané z ^1H NMR meraní boli spracované pomocou programu OPIUM.^[26]

3.2.3 Hmotnostná spektrometria (MS)

Hmotnostné spektrá boli merané na hmotnostnom spektrometri Shimadzu LCMS 2020 s elektrosprejovou ionizáciou (pozitívny aj negatívny mód) vybavenom single kvadrupólom. Vzorky boli rozpustené v MeOH a zriedené (MeOH alebo MeCN). Pri charakterizácii jednotlivých látok sú uvedené len intenzívne interpretované signály.

3.2.4 Potenciometria

Zásobné roztoky pre titrácie boli pripravené a ich koncentrácie stanovené nasledujúcim spôsobom:

Roztoky chloridov iónov kovov boli pripravené rozpustením zodpovedajúcich solí, ktoré boli vopred rekryštalizované, v deionizovanej vode. Ich koncentrácia ($\sim 0,05$ M) bola určená s presnosťou na 4 platné číslice chelatometriou.

Zásobný roztok HCl ($\sim 0,03$ M) obsahujúci $(\text{NMe}_4)\text{Cl}$ ($0,200$ M) bol pripravený z 35% vodného roztoku HCl (čistota pre stopovú analýzu). Komerčný $(\text{NMe}_4)\text{Cl}$ bol rekryštalizovaný z vrúceho *i*-PrOH a pevná soľ vysušená nad P_2O_5 vo vákuu do konštantnej hmotnosti. Presná koncentrácia zásobného roztoku bola zistená titráciou zásobným roztokom $(\text{NMe}_4)\text{OH}$.

Titračný roztok $(\text{NMe}_4)\text{OH}$ ($\sim 0,2$ M) bol pripravený použitím iónomeniča Dowex 1 v OH^- forme z rekryštalizovaného chloridu tetrametylamónneho. Elúcia prebiehala vodou zbavenou CO_2 v prúde argónu. Presná koncentrácia roztoku bola zistená odčítaním inflexných bodov titračných kriviek získaných pri titracii rôznych roztokov hydrogéntereftalátu draselného.

Zásobný roztok ligandu bol pripravený rozpustením $0,5304$ g $\text{H}_6\text{L}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ v deionizovanej vode. Na rozpustenie ligandu bol do roztoku pridávaný zásobný roztok $(\text{NMe}_4)\text{OH}$ až do celkového rozpustenia. Analytická koncentrácia zásobného roztoku ligandu bola stanovená titráciou spolu s protonizačnými konštantami pomocou programu OPIUM.

Potenciometrické titrácie boli vykonávané pomocou pH metru PHM 240 MeterLab, automatickej byrety ABU900 ovládanej počítačom a kombinovanej sklenenej elektródy GK 2401B Radiometer Analytical. Štandardné „in-cell“ titrácie boli vykonávané v titračnej cele (štartovací objem 5 ml) v deionizovanej vode za konštantnej teploty $25,0 \pm 0,1$ °C udržiavanej dvojplášťovými nádobkami pripojenými k termostatu. V priebehu kalibračných aj titračných meraní bol v aparátúre udržiavaný konštantný prúd argónu, ktorý bol prebublávaný $\sim 0,1$ M roztokom $(\text{NMe}_4)\text{Cl}$. Počiatočné dávkovanie vstupných zložiek (ligand, kov, HCl s $(\text{NMe}_4)\text{Cl}$ a HCl) bolo vykonávané pomocou byret s mikrometrickým šróbom s presnosťou $\pm 0,001$ ml. Pred každou titráciou aj kalibráciou bola cela dvakrát vypláchnutá destilovanou vodou, jedenkrát

acetónom a vysušená. Automatická byreta bola pred každým meraním resetovaná na presný objem.

Behom titrácie bola sledovaná koncentrácia voľných iónov H^+ kombinovanou argentchloridovou elektródou ako elektrochemický potenciál s presnosťou 0,1 mV. Koncentrácia vodíkových kationov bola prepočítavaná podľa Nernstovej rovnice:

$$E = E'_0 + S \cdot \log[H^+] + j_a[H^+] + j_b \left(\frac{K_w}{[H^+]} \right) \quad (5)$$

kde E'_0 je štandardný elektródový potenciál použitého prístroja, ktorý je počas titrácie udržiavaný na konštantnej hladine prítomnosťou 0,1 M $(NMe_4)Cl$. Nernstova smernica S má hodnotu blízku teoretickej hodnote 0,0591 pre teplotu 25 °C. Parametre j_a a j_b sú koeficienty kyslej a zásaditej odchýlky, člen $K_w/[H^+]$ predstavuje $[OH^-]$.

Z dôvodu reprodukovateľnosti bola každá titrácia vykonávaná trikrát. Zrovnateľnosť jednotlivých titrácií bola udržiavaná kalibráciami. Pred a po každej titrácii bola vykonaná kalibračná titrácia známeho množstva HCl zásobným roztokom $(NMe_4)OH$. Kalibračné titrácie boli opakované, až kým nedochádzalo k ďalšej zmene parametrov E'_0 a S . Titrácie boli vykonávané v oblasti $pH \sim 1,8 - 12,2$.

Konštanty stability lantanoidových komplexov boli získané metódou out-of-cell titrácie. To znamená, že jednotlivé „body“ titrácie boli namiešané do samostatných baničiek (celkový začiatkový objem 1 ml). Do každej baničky bol pomocou byret s mikrometrickým šróbom napipetovaný roztok ligandu, zásobný roztok HCl s $(NMe_4)Cl$, viac koncentrovaný roztok HCl bez $(NMe_4)Cl$ a voda ($c_L = c_M \sim 0,004$ M, 5% molárny nadbytok ligandu). Následne bolo pod prúdom argónu do každej baničky pridané známe množstvo zásobného roztoku $(NMe_4)OH$. Baničky boli pevne uzatvorené zátkami a roztoky v nich boli ponechané pri laboratórnej teplote po dobu 3 týždňov. Po uplynutí tejto doby bol v každej z baničiek nakalibrovanou elektródou zmeraný potenciál. Tieto titrácie boli vykonávané v oblasti $pH 1,5 - 7,0$.

Konštanty a štandardné odchýlky boli vypočítané pomocou programu OPIUM. Všetky získané konštanty sú konštanty koncentračné a $pH = -\log[H^+]$.

3.2.5 UV-Vis spektroskopia

Pomocou merania UV-Vis spektier bola zisťovaná rýchlosť dekomplexácie komplexu Ce–L v závislosti na koncentrácii kyseliny. Experimenty boli vykonávané v škále koncentrácie kyseliny chloristej 0,05–3,0 M pri konštantnej teplote $25 \pm 0,1$ °C, ktorá bola udržiavaná pomocou bloku typu Peltier s použitím spektrofotometra Specord 50 Plus (Analytik Jena AG). Kinetické merania prebiehali v kyvetách o optickej dĺžke 1 cm. Koncentrácia ceritého komplexu H_6L v kyvete bola 2 mM a iónová sila bola udržiavaná kombináciou $HClO_4$ a $NaClO_4$ (celková koncentrácia chloristanových aniónov v kyvete bola 3 M). Bola sledovaná časová závislosť absorbancie pri 252 nm (vlnová dĺžka absorpčného maxima $CeCl_3$), ktorá bola následne fitovaná obecnou exponenciálnou funkciou

$$A = A_f + (A_0 - A_f) \cdot e^{-k_{obs} \cdot t} \quad (6)$$

kde A je absorbancia, A_f je konečná absorbancia, A_0 je začiatočná absorbancia, t je čas a k_{obs} je experimentálne pozorovaná rýchlostná konštanta reakcie.

3.3 Syntetická časť

Súhrnná schéma navrhutej skrátenej prípravy H₆L

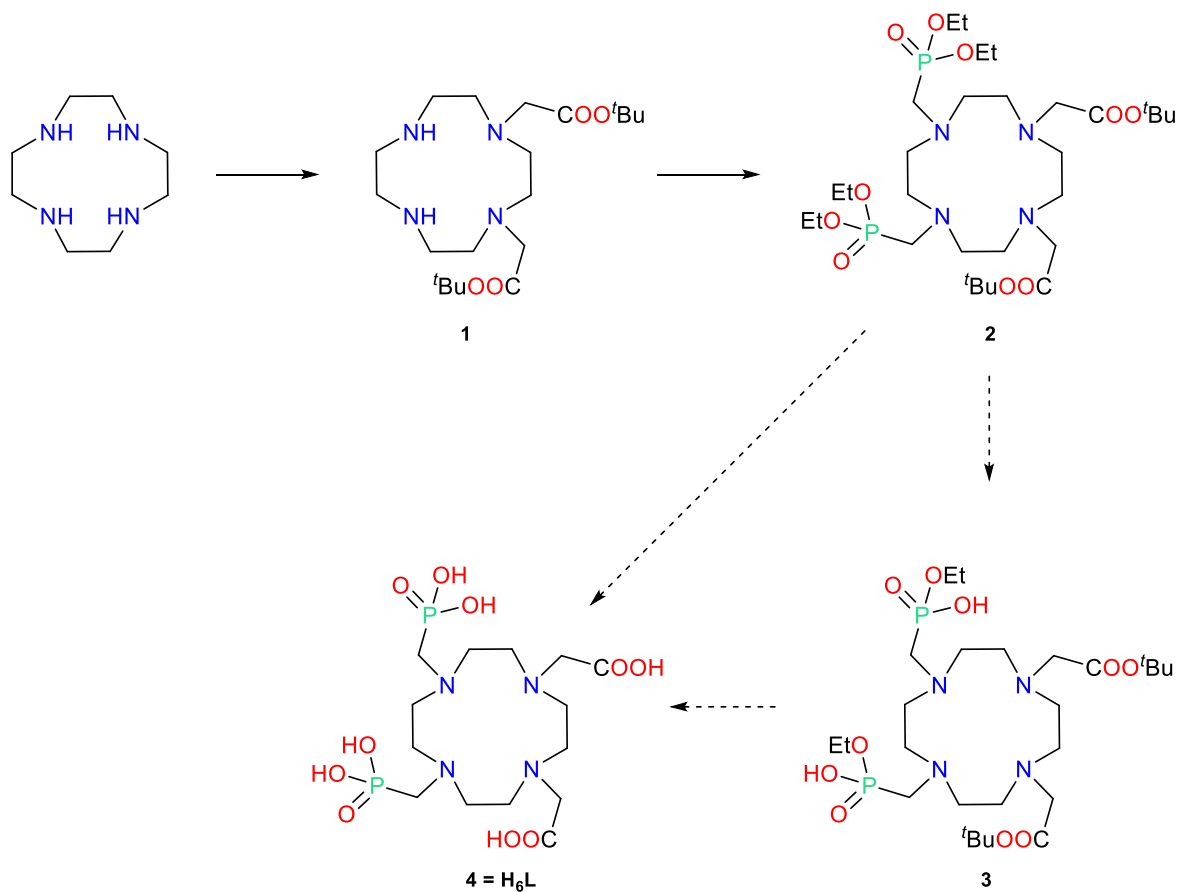


Schéma 3.1

3.3.1 Príprava 1,4-bis(*tert*-butoxykarbonylmetyl)cyklénu (1)

Látka **1** bola pripravená postupom získaným z literatúry.^[27]

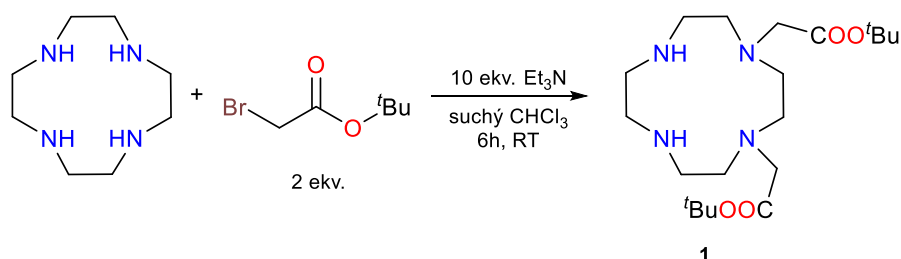


Schéma 3.2

Cyklén (400 mg, 2,32 mmol) bol navážený do 100-ml trojhrdlej banky a rozpustený v suchom CHCl₃ (40 ml). Do banky bolo umiestnené magnetické miešadlo. Na jedno z hrdiel bol umiestnený prikvapkávaci lievrik, na druhé hrdlo bol nasadený kohút s prívodom argónu, tretie hrdlo bolo uzavreté septom. Do prikvapkávacieho lieviku so zavretým kohútom bol vnesený *tert*-butylbromoacetát (2 ekv., 0,91 g, 4,64 mmol) rozpustený v suchom CHCl₃ (10 ml). Vrch lievika bol uzavretý kohútom s pripojenou bublačkou. Aparatúra bola evakuovaná a napustená argónom. K roztoku cyklénu bol injekčnou striekačkou cez septum pridaný trietylamin (10 ekv., 2,35 g, 23,2 mmol). Za stáleho miešania bol pod prúdom argónu počas doby približne 1 hodiny prikvapkávaný roztok alkylačného činidla. Po ukončení pridávania bol prúd argónu zastavený a aparatúra uzavretá kohútmi. Reakcia bola v tomto nastavení ponechaná za stáleho miešania pri laboratórnej teplote do nasledujúceho dňa.

Po ukončení reakcie bola reakčná zmes extrahovaná vodou (3-krát 40 ml). Organická fáza bola vysušená pomocou Na₂SO₄ a rozpúšťadlo odstránené pomocou RVO. Reakčná zmes bola čistená stĺpcovou chromatografiou na Al₂O₃ (mobilná fáza CHCl₃:CH₃OH=100:3 (v/v)). Frakcie obsahujúce produkt boli spojené a odparené pomocou RVO. Výsledný produkt **1** bol získaný vo forme bezfarebného oleja, ktorý po ochladení stuhol na bielu tuhú látku. Látka **1** bola pripravená v množstve 0,56 g (60 %).

Charakterizácia:

Získané charakterizačné dáta (¹H NMR, ¹³C NMR a MS) sa zhodujú s publikáciou.^[27]

3.3.2 Príprava 7,10-bis(*tert*-butoxykarbonylmetyl)-1,4-bis(dietylfosfonometyl)-cyklénu (2)

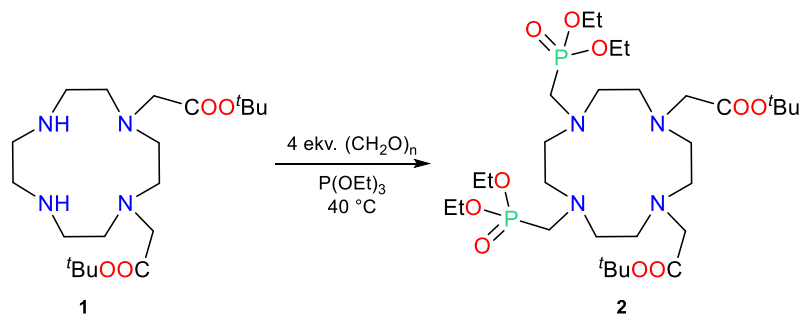


Schéma 3.3

Látka **1** (500 mg, 1,25 mmol) bola v 25-ml guľatej banke rozpustená v trietylfosfite (5 ml, použitý ako rozpúšťadlo). Do banky bolo vložené magnetické miešadlo a bola umiestnená do olejového kúpeľa na magnetickej miešačke. K zmesi bol pridaný paraformaldehyd (4 ekv., 0,15 g, 5 mmol). Reakčná zmes bola za stáleho miešania ponechaná reagovať pri teplote 40 °C po dobu 1 dňa. Priebeh reakcie bol sledovaný pomocou TLC (EtOH:NH₃=5:1 (v/v), detekcia 5% roztok CuSO₄, produkt $R_f = 0,8$) a ³¹P NMR.

Po zmiznutí škvrny reaktantu z TLC bola reakčná zmes nanesená na silný kationový iónomenič (Dowex 50, H⁺ cyklus, 300 ml), ktorý bol vopred premytý EtOH. Po nanesení reakčnej zmesi bola kolóna premývaná EtOH (odstránenie P(OEt)₃), následne EtOH:H₂O=1:1 na odstránenie iných nečistôt. Produkt bol eluovaný mobilnou fázou EtOH:NH₃=5:1 (v/v). Po odparení eluátu pomocou RVO bola látka **2** získaná vo forme žltého oleja v množstve 0,85 g (97 %).

Charakterizácia:

TLC: EtOH:NH₃=5:1 (v/v), $R_f = 0,80$ (5% roztok síranu meďnatého, svetlomodrá škvrna)

MS(+): 701,7 ([M+H]⁺; teor. 701,4); 723,1 ([M+Na]⁺; teor. 723,38)

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): $\delta = 4,00$ ppm (p, ³ $J_{\text{HH}} \sim ^3J_{\text{PH}} = 7,1$ Hz, 8 H, O–CH₂–CH₃), 3,20 ppm (s, 4H, N–CH₂–C), 2,82 ppm (d, ² $J_{\text{PH}} = 9,3$ Hz, 4 H, N–CH₂–P), 2,64–2,77 ppm (m, 16 H, N–CH₂–CH₂–N), 1,31 ppm (s, 18 H, O–C–CH₃), 1,19 ppm (t, ³ $J_{\text{HH}} = 7,12$ Hz, 12 H, O–CH₂–CH₃)

³¹P{¹H} NMR (121 MHz, CDCl₃): $\delta = 32,07$ (s)

3.3.3 Spôsoby prípravy deesterifikovaných látok (3) a (4)

- Súhrnná schéma:

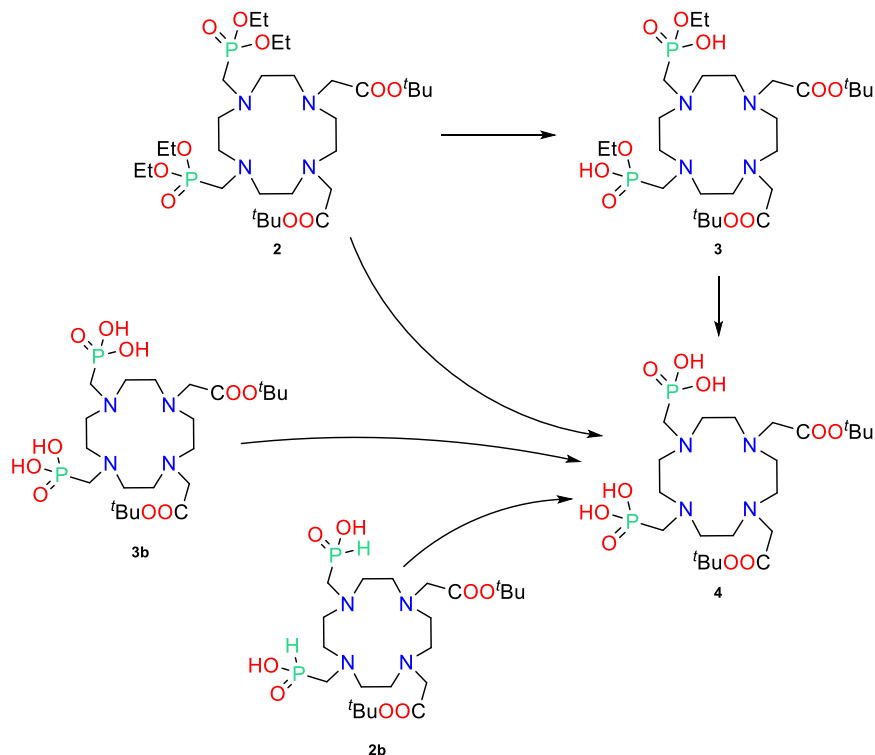


Schéma 3.4

3.3.4 Bázická hydrolýza látky (2) alkalickým hydroxidom – príprava látky (3)

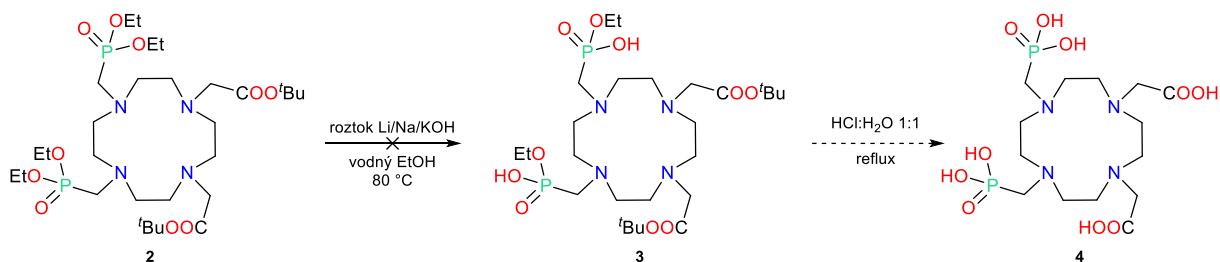
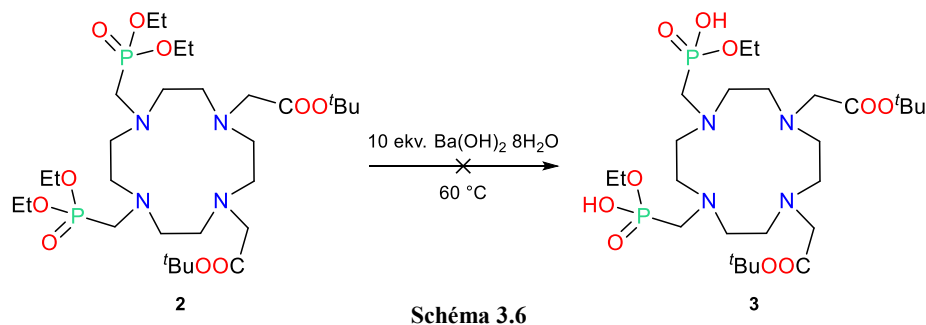


Schéma 3.5

Látka 2 (200 mg, 0,29 mmol) bola v 50-ml banke rozpustená vo vodnom roztoku EtOH (~80%, 20 ml). Do banky bolo vložené magnetické miešadlo. pH roztoku bolo upravené na cca 13 použitím 1M vodného roztoku hydroxidu alkalického kovu – reakcia bola vyskúšaná s použitím hydroxidu lítneho, sodného aj draselného za totožných podmienok. Reakčná zmes bola zahrievaná za stáleho miešania pri teplote 80 °C po dobu dvoch dní. Priebeh reakcie bol sledovaný pomocou ³¹P NMR. Po ukončení zahrievania boli v ³¹P NMR spektre pozorované viaceré signály (20,15; 18,83; 3,39; -

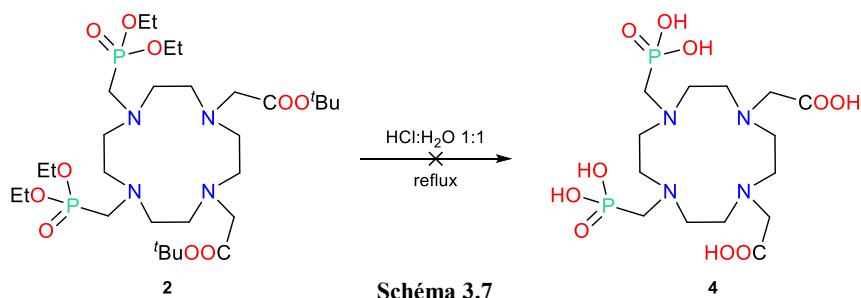
1,28, -2 ppm). Reakčná zmes bola preto nanosená na silný kationový iónomenič (Dowex 50, H^+ cyklus, 300 ml). Stĺpec iónomeniča bol premývaný vodou na odstránenie nečistôt, produkt bol eluovaný 10% vodným roztokom pyridínu. Po odparení eluátu pomocou RVO a zmeraní 1H a ^{31}P NMR spektra sa ukázalo, že látku **3** sa postupom bázeickej hydrolýzy nepodarilo získať (bez ohľadu na kation použitého hydroxidu), pravdepodobne kvôli degradácii v čistiacom kroku (signály pozorované v ^{31}P NMR spektre: 28,84; 28,20; 27,14; 21,57; 20,11; 18,69; 16,60; 14,82; 13,52; 11,28 ppm).

3.3.5 Použitie $Ba(OH)_2$ – príprava látky (**3**)



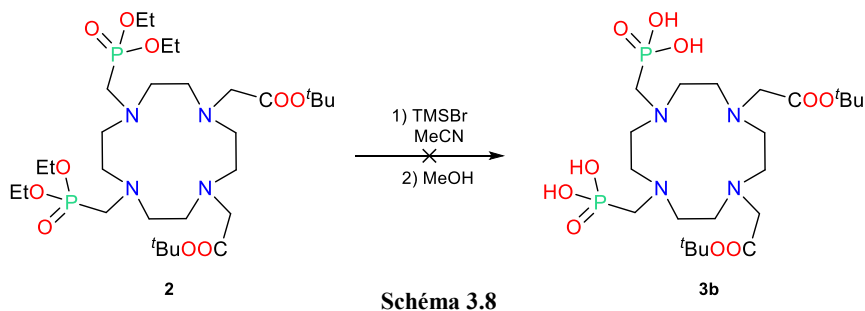
Látka **2** (200 mg, 0,29 mmol) bola v 50-ml banke rozpustená v EtOH (20 ml). Do banky bolo vložené magnetické miešadlo. Do roztoku bol pridaný $Ba(OH)_2 \cdot 8H_2O$ (10 ekv., 0,9 g, 2,9 mmol). Zmes bola v olejovom kúpeli zahrievaná na teplotu 60 °C do nasledujúceho dňa a sledovaná pomocou ^{31}P NMR (19,02 ppm). Po ukončení reakcie bola do zmesi po malých častiach pridávaná koncentrovaná kyselina sírová, až do mierne kyslého pH zmesi. Vzniknutá zrazenina síranu bárnateho bola odstránená centrifugáciou. Následne bola zmes nanosená na silný kationový iónomenič (Dowex 50, H^+ cyklus, 300 ml). Stĺpec bol premývaný H_2O do neutrálneho pH na odstránenie prebytočnej H_2SO_4 , produkt bol eluovaný mobilnou fázou EtOH: NH_3 =5:1. Následne zmerané ^{31}P NMR spektrum ukázalo rozpad vzorky (pozorované signály: 25,17; 22,06; 19,78; 14,23 ppm). Látku **3** sa týmto spôsobom nepodarilo pripraviť.

3.3.6 Priama kyslá hydrolýza (2) – príprava látky (4)



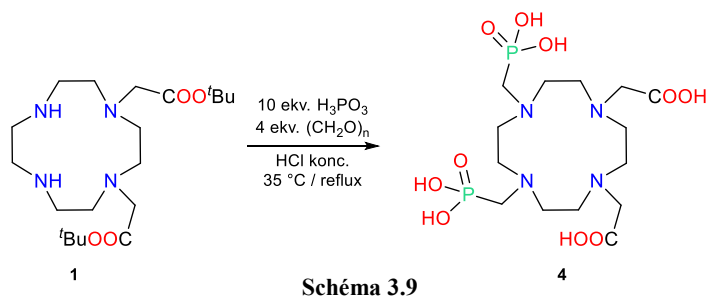
Látka **2** (100 mg, 0,14 mmol) bola v 25-ml banke rozpustená v 6M HCl (10 ml). Reakčná zmes bola v olejovom kúpeli zahrievaná k varu pod spätným chladičom cez noc. Rozpúšťadlo bolo následne odparené pomocou RVO. ^{31}P NMR spektrum reakčnej zmesi ukázalo píky niekoľkých rôznych fosforových komponentov, čo poukazovalo na rozpad produktu. Látka **4** nebola týmto spôsobom pripravená.

3.3.7 Deesterifikácia použitím TMSBr – príprava látky (3b)



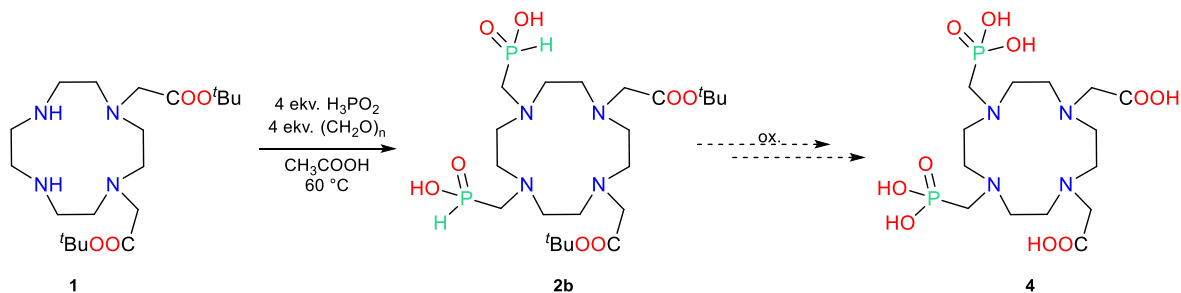
Látka **2** (200 mg, 0,29 mmol) bola v 25-ml banke rozpustená v bezvodom acetonitrile (10 ml). Ten bol následne odparený pomocou RVO, a odparok opäť rozpustený v bezvodom MeCN (10 ml). Banka bola opatrená magnetickým miešadlom a umiestnená na magnetickú miešačku. Do banky bol injekčnou striekačkou pridaný trimetylsilylbromid (20 ekv., 2,2 g, 5,8 mmol). Banka bola obalená alobalom a ponechaná miešať pri laboratórnej teplote. Priebeh reakcie bol sledovaný pomocou ^{31}P NMR. V NMR spektre neboli najskôr pozorované žiadne zmeny. Po nejakom čase však ^{31}P NMR spektrum ukázalo niekoľko rôznych signálov. Z nich niektorý mohol patriť žiadanému produktu, ale malé zastúpenie v zmesi iných neznámych produktov viedlo k ukončeniu reakcie bez snahy o izoláciu produktu. Látku **3b** sa týmto postupom nepodarilo pripraviť.

3.3.8 Reakcia Mannichovho typu s H_3PO_3 – príprava látky (4)



Látka **1** (240 mg, 0,6 mmol) a kyselina fosforitá (10 ekv., 500 mg, 6 mmol) boli v 25-ml banke rozpustené v 6M HCl (10 ml). Do banky bol pridaný paraformaldehyd (16 ekv., 290 mg, 9,6 mmol) a reakčná zmes bola zahrievaná v olejovom kúpeli pri teplote 35 °C po dobu 2 dní. Po uplynutí tejto doby podľa ^{31}P NMR neprebehla žiadna reakcia, zmes preto bola pod spätným chladičom zahrievaná k varu po dobu niekoľkých hodín. Za tento čas došlo k výraznému stmavnutiu pôvodne bezfarebného roztoku. V ^{31}P NMR spektre bol však stále pozorovaný len signál kyseliny fosforitej. Reakcia preto bola ďalej zahrievaná a sledovaná, no zmena v spektre nenastala ani po niekoľkých dňoch, reakcia preto bola ukončená. Látka **4** nebola týmto postupom pripravená.

3.3.9 Fosfinátový analóg – príprava látky (2b)



Látka **1** (150 mg, 0,37 mmol) bola v 25-ml banke rozpustená v koncentrovanej kyseline octovej (10 ml). Injekčnou striekačkou bola do zmesi pridaná kyselina fosforná vo forme 50% vodného roztoku (4 ekv., 112 mg, 1,5 mmol). Ďalej bol pridaný paraformaldehyd (4 ekv., 45 mg, 1,5 mmol). Reakčná zmes bola zahrievaná v olejovom kúpeli pri teplote 50–60 °C po dobu niekoľkých dní. Priebeh reakcie bol sledovaný ^{31}P NMR (33,65; 28,9; 20,0 ppm). Následne bolo rozpúšťadlo odparené pomocou RVO

a zmes bola nanosená na silný kationový iónomenič (Dowex 50, H⁺ cyklus, 300 ml). Ten bol následne niekoľkokrát premytý vodou na odstránenie prebytočnej kyseliny a iných nečistôt. Produkt bol eluovaný 10% vodným roztokom pyridínu. Rozpúšťadlo bolo odparené pomocou RVO a bolo zmerané ³¹P NMR spektrum produktu. To ukázalo na prítomnosť niekoľkých látok obsahujúcich fosforové komponenty (24,98; 20,06; 18,79; 14,26; 13,63 ppm). Izolácia produktu **2b** nebola týmto spôsobom úspešná.

3.3.10 Príprava tri-*tert*-butyl fosfitu ako činidla pre Mannichovu reakciu

Látka bola pripravovaná podľa postupu uvedeného v literatúre.^[28]

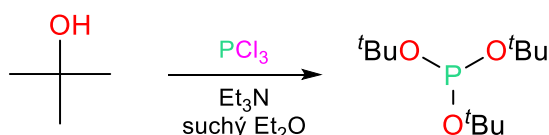


Schéma 3.11

Terc-butanol (3 ekv., 25 g, 340 mmol) a trietylamin (3 ekv., 34 g, 340 mmol) boli pri teplote 0 °C (ľadový kúpeľ) v 1000-ml trojhrdlej banke rozpustené v suchom Et₂O. Na hrdlá banky boli umiestnené postupne: kohút na prívod argónu, kohút s pripojenou bublačkou, sklenená zátka. Všetky zábrusy boli natreté silikónovým tukom. Aparatúra bola 3-krát sekurovaná, následne bola v protiprúde argónu sklenená zátka vymenená za gumené septum. Chlorid fosforitý (1 ekv., 15,4 g, 113 mmol) rozpustený v suchom Et₂O (30 ml) bol cez septum pomaly prikvapkávaný k reakčnej zmesi pomocou injekčnej striekačky. Teplota reakčnej zmesi bola počas pridávania PCl₃ udržiavaná medzi 2–5 °C pomocou ľadového kúpeľa. Po ukončení pridávania bola reakčná zmes ponechaná miešať hodinu za stáleho chladenia na teplotu 2–5 °C. Po uplynutí tohto času bol chladiaci kúpeľ odstránený a reakčná zmes bola miešaná ďalších 14 hodín pri laboratórnej teplote. Počas celej doby reakcie aparátúrou prúdil argón. Po ukončení reakcie bola reakčná zmes prefiltrovaná, boli odobraté vzorky na charakterizáciu. Po umiestnení do chladničky zmes stuhla. Podľa ¹H aj ³¹P NMR reakcia prebehla čisto, neboli pozorované žiadne nežiaduce produkty, zmes nebola pred ďalšou reakciou preto nijak čistená.

Charakterizácia:

Získané charakterizačné dáta (¹H NMR, ³¹P NMR) sa zhodujú s publikáciou.^[28]

3.3.11 Použitie $P(t\text{-BuO})_3$

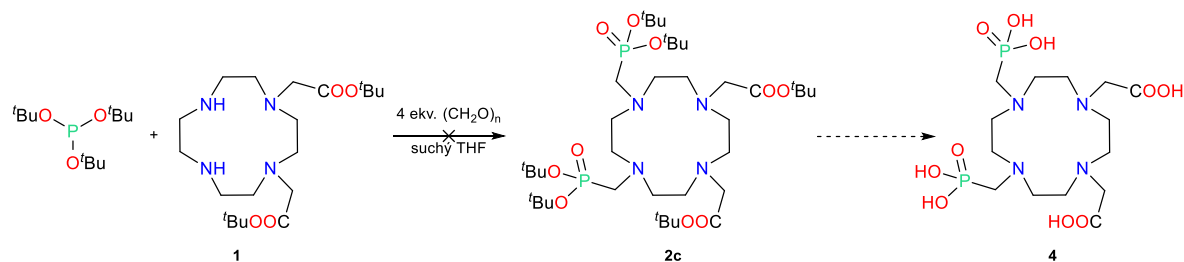


Schéma 3.12

Do 100-ml trojhrdlej banky bola navážená látka **1** (100 mg, 0,25 mmol). Na hrdlá banky boli umiestnené: kohút na prívod argónu, kohút s pripojenou bublačkou, gumené septum. Aparatúrou prúdil argón. Látka **1** bola rozpustená v suchom THF (10 ml) pridanom injekčnou striekačkou cez septum. Následne bol v protiprúde argónu pridaný paraformaldehyd (4 ekv., 30 mg, 1 mmol) a reakčná zmes bola ponechaná miešať v tomto nastavení po dobu 1 hodiny. Ďalej bol do reakčnej zmesi pridaný tri-*terc*-butyl fosfit (2 ekv., 125 mg, 0,5 mmol) a zmes bola miešaná do nasledujúceho dňa. Podľa ^{31}P NMR reakcia neprebehla.

3.3.12 Príprava 1,4-karbonylmetyl-cyklénu (**1a**)

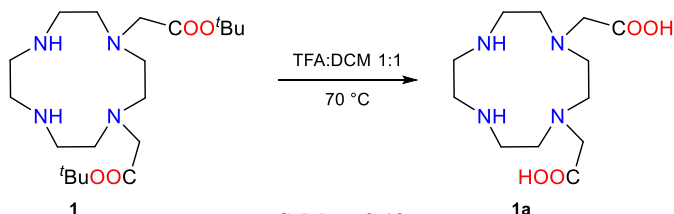


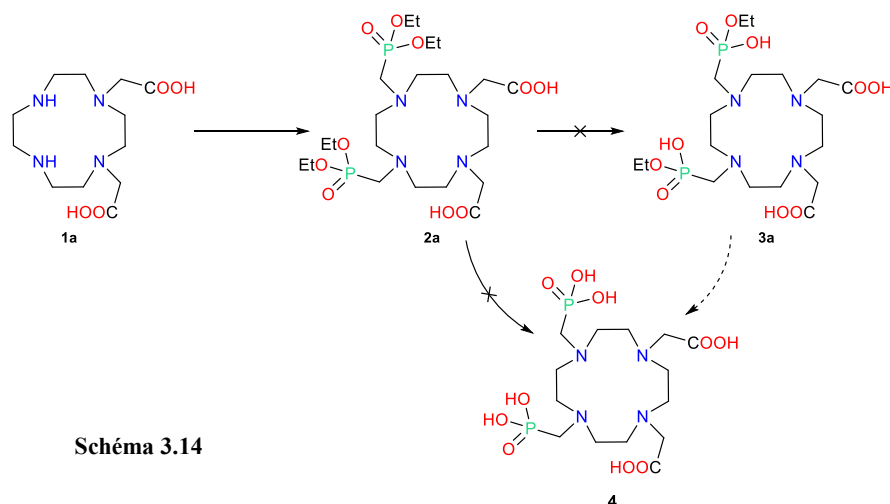
Schéma 3.13

Látka **1** (200 mg, 0,5 mmol) bola v 25-ml banke rozpustená v zmesi kyseliny trifluóroctovej a dichlórmétanu (TFA:DCM=1:1 (v/v)). Banka bola na olejovom kúpeli zahrievaná pod spätným chladičom k varu po dobu 3 hodín. Následne boli prchavé časti zmesi odparené pomocou RVO. Podľa ^1H NMR spektra bola reakcia úspešná. Látka **1a** nebola pred ďalším použitím nijak čistená.

Charakterizácia:

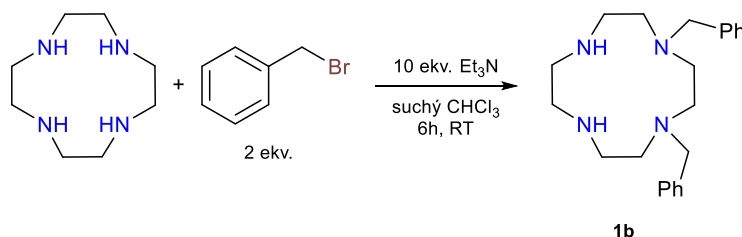
^1H NMR (300 MHz, CD_3OD): 3,31 ppm (s, 4 H, $\text{N-CH}_2\text{-CO}$), 2,46 – 2,67 (m, 16 H, $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}$)

Využitie látky **1a** v ďalšej syntéze



Vyššie popísané reakcie boli vyskúšané s látkou **1a** ako vstupným reaktantom namiesto látky **1** analogickými postupmi. Ani touto cestou však látka **4** nebola získaná.

3.3.13 Príprava 1,4-bis-benzyl-cyklénu (**1b**)



Rovnakým spôsobom ako látka **1** bola pripravená látka **1b**. Cyklén (400 mg, 2,32 mmol) bol navážení do 100-ml trojhrdlej banky a rozpustený v suchom CHCl_3 (40 ml). Do banky bolo umiestnené magnetické miešadlo. Na jedno z hrdiel bol umiestnený prikvpávací lievik, na druhé hrdlo bol nasadený kohút s prívodom argónu, tretie hrdlo bolo uzavreté septom. Do prikvpávacieho lieviku so zavretým kohútom bol vnesený benzylbromid (2 ekv., 0,79 g, 4,64 mmol) rozpustený v suchom CHCl_3 (10 ml). Vrch lievika bol uzavretý kohútom s pripojenou bublačkou. Aparatúra bola evakuovaná a napustená argónom. K roztoku cyklénu bol injekčnou striekačkou cez septum pridaný trietylamin (10 ekv., 2,35 g, 23,2 mmol). Za stáleho miešania bol pod prúdom argónu počas doby približne 1 hodiny prikvpávaný roztok alkylačného činidla. Po ukončení pridávania bol prúd argónu zastavený a aparatúra uzavretá kohútmi. Reakcia bola

v tomto nastavení ponechaná za stáleho miešania pri laboratórnej teplote do nasledujúceho dňa.

Po ukončení reakcie bola reakčná zmes extrahovaná vodou (3-krát 40 ml). Organická fáza bola vysušená pomocou Na_2SO_4 a rozpúšťadlo odstránené pomocou RVO. Reakčná zmes bola čistená stĺpcovou chromatografiou na Al_2O_3 (mobilná fáza $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}=100:3$ (v/v)). Frakcie obsahujúce produkt boli spojené a odparené pomocou RVO. Látka **1b** bola pripravená vo forme nažltnutého oleja, z ktorého boli odobrané vzorky na charakterizáciu. Výťažok reakcie bol 0,13 g (16 %). Z dôvodu nízkeho výťažku nebola látka **1b** ďalej použitá v syntéze.

Charakterizácia:

Získané charakterizačné dáta (^1H NMR a ^{13}C NMR) sa zhodujú s publikáciou.^[27]

3.3.14 Súhrnná schéma pôvodnej syntézy H₆L

Ligand H₆L bol pripravený podľa postupov uvedených v literatúre.^{[29],[30]}

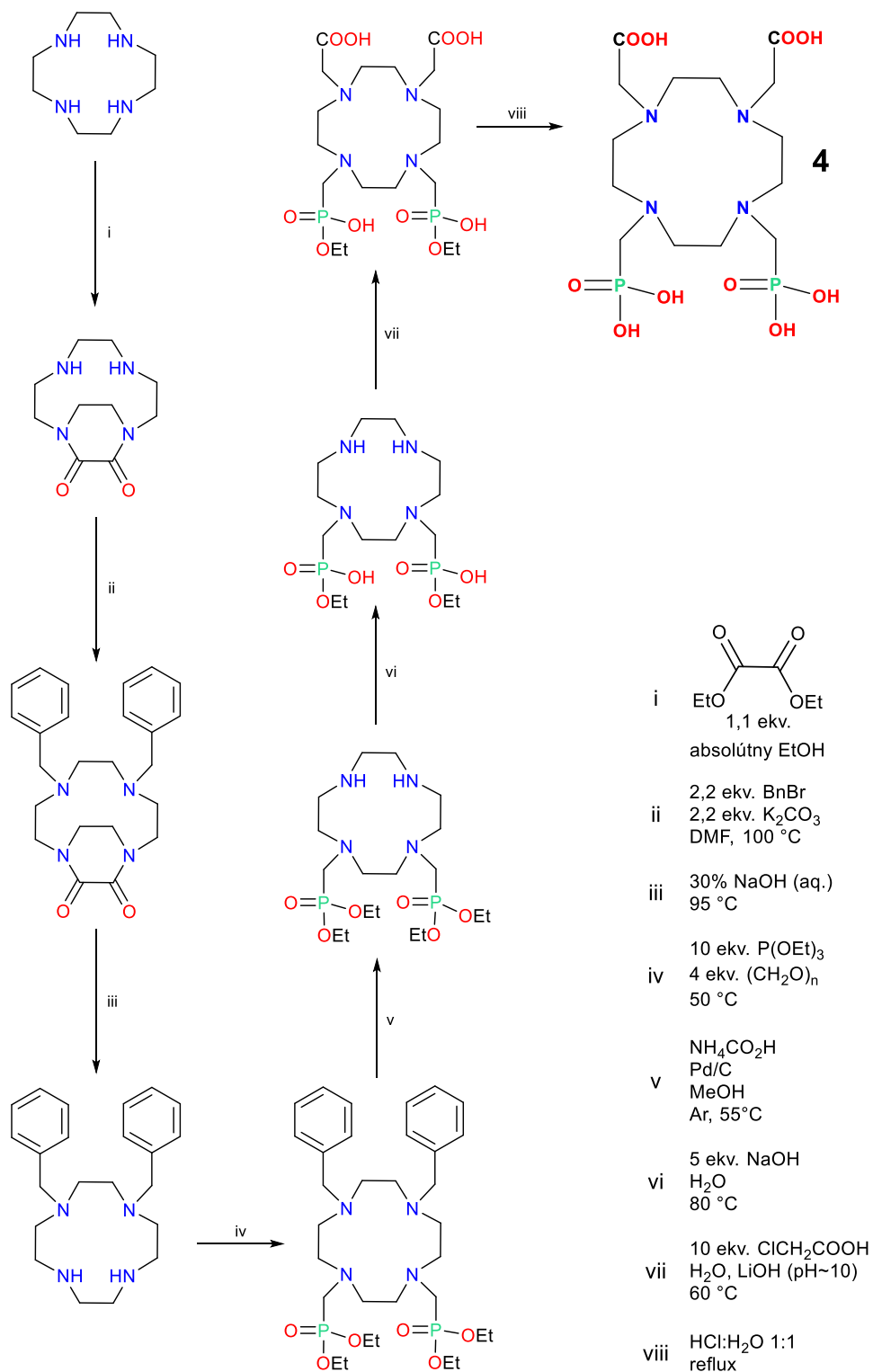


Schéma 3.16 – schéma syntézy ligandu H₆L a jednotlivé reakčné podmienky

3.3.15 Príprava komplexov Ln–L

Lantanoidové komplexy ligandu *cis*-DO2A2P boli pripravované z navážok ligandu ($H_6L \cdot 3H_2O$) 15–20 mg v 4-ml vialkách. K ligandu bola pridaná voda (3 ml) a pH bolo upravené na hodnotu ~4–5 pomocou 1M vodného roztoku LiOH. K roztoku bolo pridané podstechiometrické množstvo (0,95 ekv.) príslušnej lantanoidovej soli ($LnCl_3 \cdot xH_2O$) v pevnom stave. Následne bolo pomocou 1M vodného roztoku LiOH pH zmesi upravené na hodnotu približne 8–9. Hodnota pH následne pomaly klesala z dôvodu komplexácie iónu Ln^{3+} . Po ustálení pH bolo toto znova upravené na hodnotu 8–10. Takto pripravené roztoky boli umiestnené do olejového kúpeľa, kde boli pri teplote 60 °C ponechané miešať do nasledujúceho dňa.

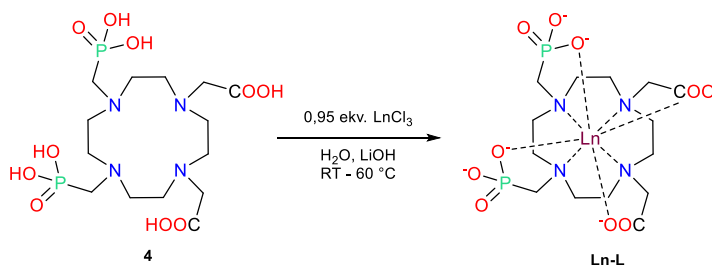


Schéma 3.17

Vzhľadom na hygroskopickosť chloridov lantanoidových iónov je možné, že výsledná koncentrácia komplexu bola nižšia ako teoretický výpočet. Na NMR merania komplexov je však bežne používaný nadbytok ligandu, preto tento rozdiel nečinil vo výsledku problém.

Komplex $Ce-H_6L$ pre UV-Vis kinetické merania bol pre väčšiu presnosť pripravovaný z vodného roztoku $CeCl_3$ s presnou koncentráciou 0,05118 M.

4 Výsledky a diskusia

4.1 Vyskúšané syntetické cesty prípravy H_6L

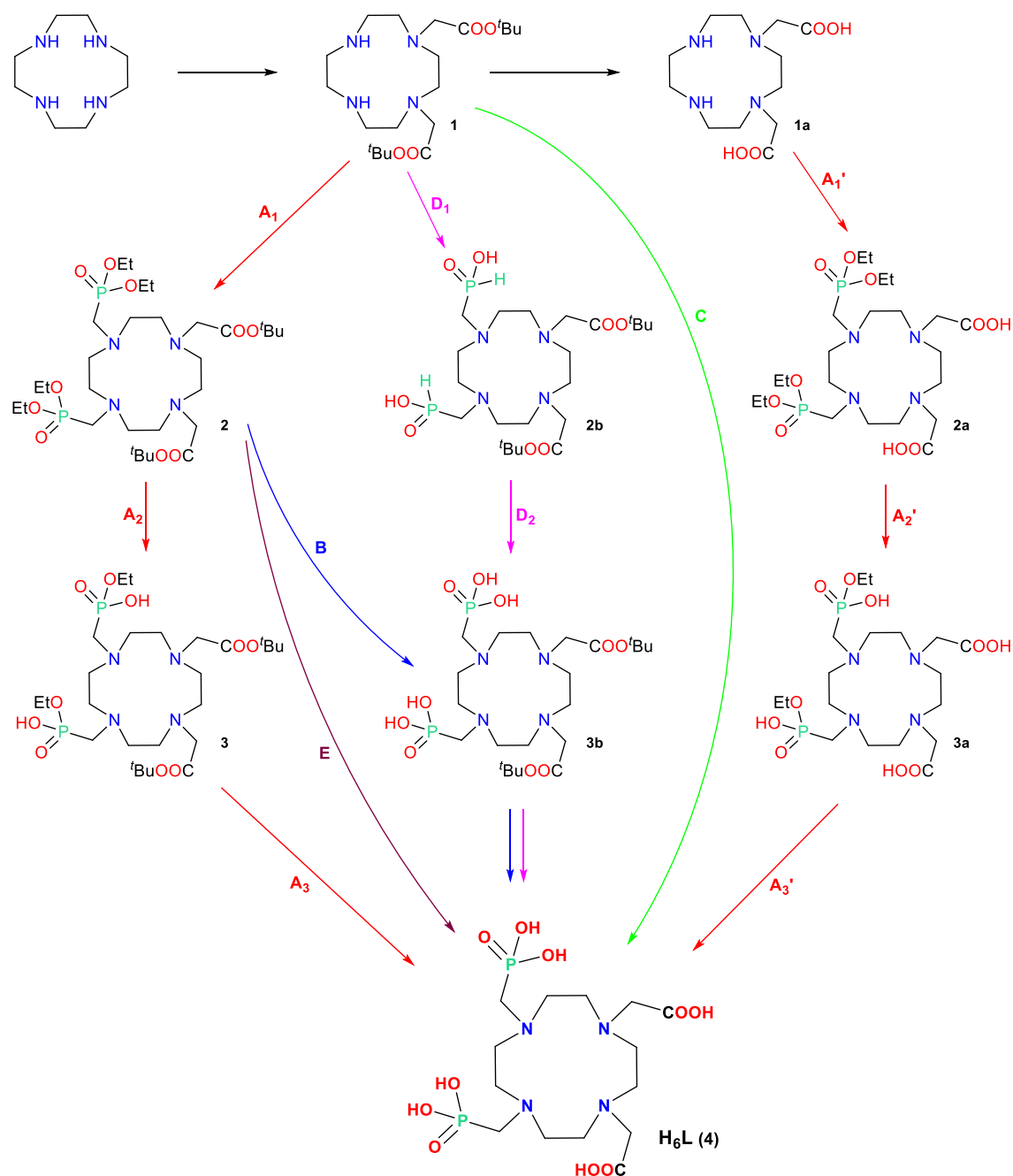


Schéma 4.1 – syntetické cesty prípravy ligandu diskutované v tejto kapitole

Syntézu ligandu *cis*-DO2A2P, ktorá bola navrhnutá na začiatku práce, sleduje syntetická cesta **A**. Jej jednotlivé kroky boli popísané v časti **3.3**. Syntetická cesta zahŕňa reakciu Mannichovho typu na látke **1** nasledovanú bázickou hydrolýzou látky **2** (krok **A**₁). Tá by mala selektívne viesť ku vzniku monoesterovej formy fosfonátových pendantných ramien. Tento krok bol použitý už v mnohých predošlých prípadoch preto, že ligandy v plne-esterovej forme nedokázali vydržať podmienky kyslej hydrolýzy (táto skutočnosť bola tiež experimentálne overená v kroku **E**). Po prevedení do monoesterovej formy mal byť ligand H₆L pripravený následnou kyslou hydrolýzou v 6M HCl. Pri kroku **A**₂ ale opakovane dochádzalo k rozpadu látky **2** (podľa ³¹P NMR). Žiadaný ligand sa preto touto cestou nepodarilo pripraviť.

Rovnaká syntetická stratégia (**A'**) bola aplikovaná aj na ochránený prekurzor DO2A (látka **1a**). Reakcia **A**₁' prebehla úspešne rovnako ako reakcia **A**₁. Analogický problém sa ale ukázal pri reakcii **A**₂', kedy bol opäť pozorovaný rozpad látky. Keďže krízovým krokom sa javila deesterifikácia fosfonátových pendantných ramien bez ohľadu na to, či sú acetátové ramená ochránené, v ďalšej syntéze bola používaná iba chránená *t*-Bu₂DO2A (látka **1**).

Ďalším možným spôsobom prípravy **L** sa javilo použitie TMSBr. Etylestery fosfonátových skupín by v tejto reakcii boli prevedené na labilnejšie trimetylsilylestery, ktoré je možné následne hydrolyzovať látkami obsahujúcimi –OH skupiny, napr. MeOH. Tieto dva kroky sú zhrnuté v kroku **B**. Táto reakcia však tiež nebola úspešná. Reakcia vyžaduje striktné bezvodé podmienky (použitie rozpúšťadla MeCN). Dôvodom neúspechu preto mohla byť nedostatočná suchosť použitého rozpúšťadla. Iným dôvodom by mohol byť veľký objem trimetylsilylesterových skupín. Ich naviazanie nemuselo byť stericky umožnené vzhľadom na blízkosť fosfonátových skupín v polohe *cis*.

V kroku **C** bola vyskúšaná reakcia Mannichovho typu s použitím kyseliny fosforitej. Tá by mala viesť priamo k fosfonátovým pendantným ramenám, bez nutnosti zavádzania zjavne problémových etylesterov. Reakcia bola vyskúšaná pri laboratórnej teplote, aj pri teplote zvýšenej. Ani v jednom prípade neviedla táto reakcia k zisku produktu.

Vzhľadom na predošlé neúspechy bol uskutočnený pokus o prípravu fosfinátového analógu látky **2** (látka **2b**). V prípade úspešnej syntézy by bol tento ďalej oxidovaný za

vzniku látky **3b** (krok **D₂**). Na prípravu látky **2b** bola zvolená reakcia Mannichovho typu s použitím kyseliny fosfornej v kyslom prostredí (**D₁**). Počas reakcie vznikalo podľa ^{31}P NMR niekoľko rôznych látok. Táto skutočnosť bola očakávateľná, keďže okrem rôznej substitúcie fosfinátových pendantných ramien mohlo v kyslom prostredí dochádzať k hydrolýze *t*-butylesterov v rôznych pomeroch. Množstvo signálov v ^{31}P NMR spektre sa ale neznížilo ani po niekoľkých dňoch zahrievania reakčnej zmesi na 60 °C. Reakčná zmes bola čistená na silnom kationovom iónomeniči, vzniknuté rôzne látky sa ale nepodarilo rozdeliť a izolovať produkt.

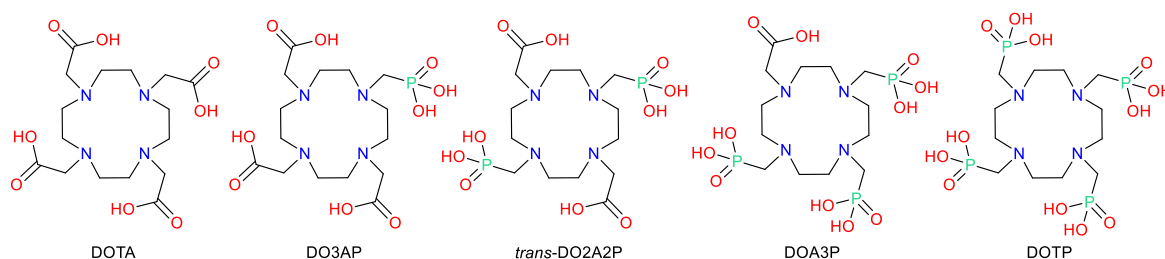
Reakčné cesty **A**, **B** a **D** mali byť ukončené hydrolýzou *t*-butylových esterov v kyslom prostredí, no vzhľadom na neúspech pri predchádzajúcich krokoch nebola táto reakcia uskutočnená.

Vzhľadom na náročnosť odstraňovania etylesterov bola vyskúšaná reakcia s $(t\text{-BuO})_3\text{P}$ (**3.3.11**). Zámerom bolo zavedenie ľahšie odstupujúcej skupiny, čo by malo uľahčiť prípravu cieľového ligandu. Reakcia však nebola úspešná, čo mohlo byť opäť spôsobené sterickou náročnosťou *t*-butylových skupín.

Po sérii neúspešných pokusov o zjednodušenie pôvodnej syntézy bola táto snaha ukončená a cieľový ligand **H₆L** bol pripravený už známym postupom (*Schéma 3.16*).^[29]

4.2 Potenciometrické štúdie H_6L

Potenciometrické titrácie boli vykonávané s 0,02M zásobným roztokom ligandu H_6L , pripravenom v deionizovanej vode. Na rozpustenie ligandu bol použitý roztok titračného hydroxidu tetrametylamónneho ($c = \sim 0,2$ M, 2,75 ekv.). Koncentrácia ligandu v titrovaných roztokoch bola približne 0,004 M, presné látkové množstvo bolo zistené pri stanovovaní disociačných konštánt pomocou programu OPIUM. Študované boli interakcie s vybranými iónmi Ln^{3+} (Ce^{3+} , Lu^{3+}) a vybranými iónmi prechodných kovov (Cu^{2+} , Zn^{2+}). Získané dáta boli porovnávané s vybranými ligandami odvodenými od DOTA (DOTA, DOTP, DO3AP, DOA3P, *trans*-DO2A2P; Obr. 4.1) a ich komplexmi.



Obrázok 4.1 – ligandy porovnávané s H_6L v potenciometrickej štúdii stability komplexov

4.2.1 Stanovenie disociačných konštánt H_6L

Ligand H_6L obsahuje vo svojej molekule 6 odštiepiteľných protónov a 4 amínové skupiny. Hodnotu najvyššej disociačnej konštanty nebolo možné vzhľadom k jej vysokej hodnote určiť potenciometricky, bola preto dodatočne získaná pomocou programu OPIUM z chemického posunu jadier 1H v závislosti na pH z NMR merania. Vysoká bazicita je pripisovaná rozdeleniu elektrónovej hustoty blízkej úplne deprotonizovanej fosfonátovej skupiny na najbližšie atómy dusíku, alebo formácii silných vodíkových väzieb cez etylénové reťazce.^{[31],[32]} Podobné vlastnosti boli pozorované pre mnohé polyamino-polyfosfónové kyseliny, makrocyclické ligandy nevynímajúc.

Celkové protonizačné konštanty sú označované $\log\beta_n$, kde $\beta_n = [H_nL]/([H]^n[L])$. Hodnoty získaných protonizačných konštánt a ich porovnanie s podobnými ligandami je uvedené v Tab. 4.1. Distribučný diagram H_6L ukazuje Obr. 4.2.

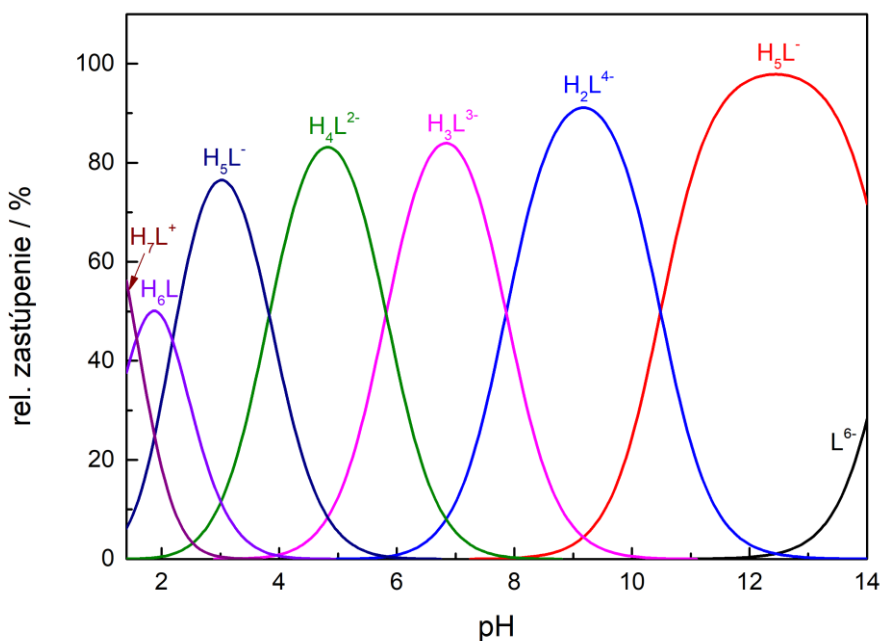
Tabuľka 4.1 – Celkové a postupné protonizačné konštanty H_6L a ich porovnanie s podobnými ligandami

	H_6L^a	H_4dota	H_5do3ap	$H_6do2a2p^b$	H_7doa3p	H_8dotp
$\log K_1$	14,4 ^c 14,4±0,08	12,90 ^c	13,83 ^c	13,02 ^c	13,60 ^c	14,65 ^c
$\log K_2$	10,49 24,89±0,01	9,72	10,35	11,82	11,42	12,4
$\log K_3$	7,86 32,75±0,02	4,60	6,54	6,35	7,69	9,28
$\log K_4$	5,82 38,57±0,03	4,13	4,34	6,33	6,33	8,09
$\log K_5$	3,83 42,40±0,03	2,36	3,09	3,13	5,13	6,20
$\log K_6$	2,19 44,59±0,03	--	1,63	2,64	2,73	5,22
$\log K_7$	1,57 46,16±0,04	--	1,07	--	1,62	1,77
$\Sigma \log K_a^d$	24,89	21,62	24,18	24,84	25,02	27,05
Ref.	Táto práca	[33]	[16]	[20]	[20]	[34]

^a hodnoty celkových protonizačných konštánt $\log \beta_n$ stanovených potenciometriou sú uvedené kurzívou;

^b $H_6do2a2p$ = *trans* izomér ligandu DO2A2P; ^c hodnoty určené pomocou $^{31}P/^1H$ NMR spektrometrie;

^d $\Sigma \log K_a = \log K_1 + \log K_2$.



Obrázok 4.2 – Distribučný diagram rôzne protonizovaných foriem ligandu H_6L v závislosti na pH.
($I = 0,1$ M $(NMe_4)Cl$, 25 °C)

Predpokladaný mechanizmus protonizácie by mal byť obdobný ako u *trans*-DO2A2P. Prvé dve protonizácie sa objavujú na atónoch dusíku makrocyclu. Kvôli elektrostatickej repulzii musia byť tieto dva protóny viazané k protiľahlým atómom dusíku. Celková bazicita atómov dusíku ($\log K_1 + \log K_2$) H_6L je vyššia ako pre H_4dota a H_5do3ap , takmer totožná s *trans*-izomérom $H_6do2a2p$ a nižšia ako pre H_7doa3p a H_8dotp . Toto pozorovanie zapadá do obecného trendu – t. j. väčší počet fosfonátových pendantných ramien vedie k ligandom s vyššou bazicitou. Tretia a štvrtá protonizácia nastáva na fosfonátových skupinách a ďalšie dve protonizácie v silne kyslej oblasti pH (pH~2–4) zodpovedajú protonizácii karboxylátových skupín. Protonizácie fosfonátových a acetátových ramien sú spojené s redistribúciou H^+ medzi atómami dusíku makrocyclu.^{[16],[17],[20],[31]} Hodnota prvej disociačnej konštanty je ale pre ligand *cis*-DO2A2P výrazne vyššia ako pre *trans*-izomér. Možným dôvodom je *cis*-usporiadanie fosfonátových pendantných ramien, ktoré pripomína časť molekuly DOTP, ktorého prvá disociačná konštantá je v danej sérii ligandov najvyššia.

4.2.2 Interakcie H_6L s vybranými iónmi Ln^{3+}

Potenciometrickými titraciami boli sledované interakcie H_6L s iónmi Ce^{3+} a Lu^{3+} . Vzhľadom k pomalej kinetike komplexácie lantanoidových iónov boli tieto titrácie vykonávané metódou „out-of-cell“ (kap. 2.2.6). Titrácie boli vykonávané v pomere ligand:kov=1:1 (mol). Získané hodnoty konštánt stability sú uvedené v *Tab. 4.2*.

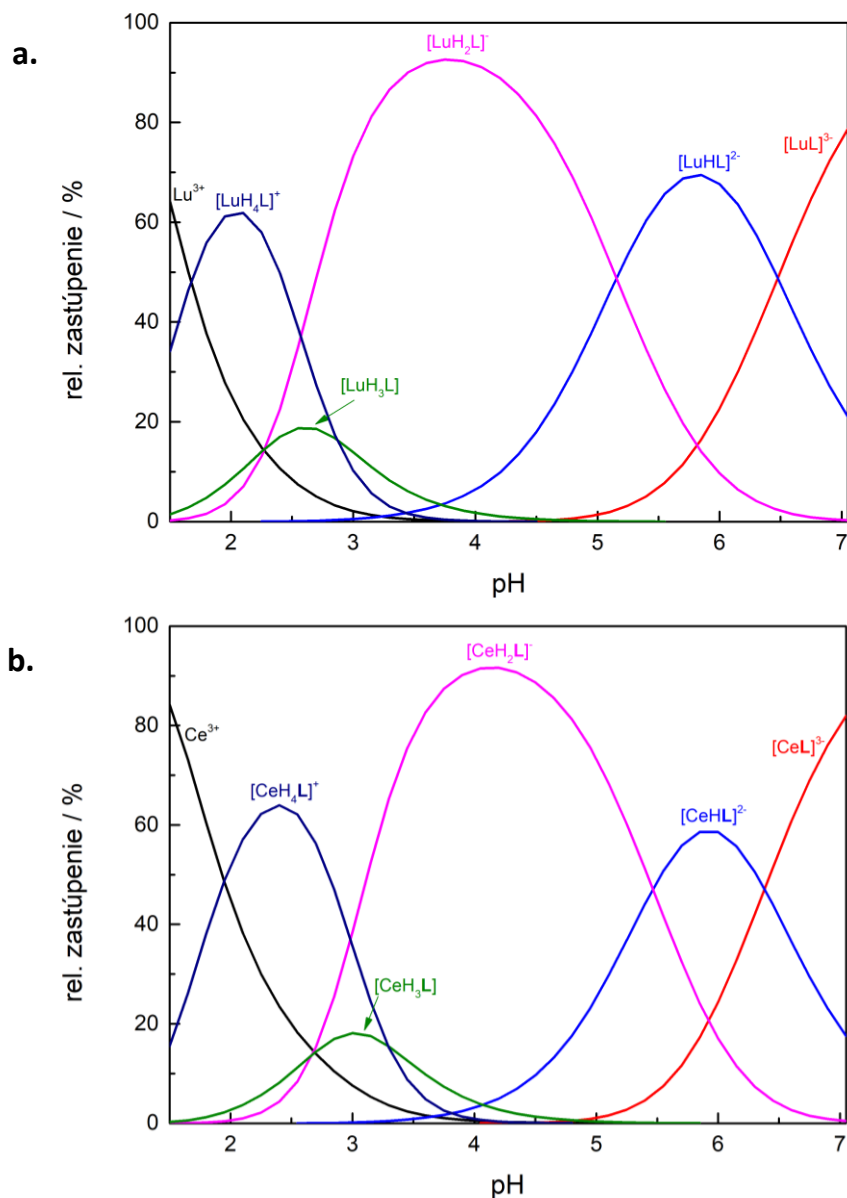
Tabuľka 4.2 – Protonizačné konštanty a zodpovedajúce celkové konštanty stability v systéme (Ce/Lu)– H_6L

Rovnováha	CeL		LuL	
	$\log \beta^a$	$\log K$	$\log \beta$	$\log K$
$M + L \rightleftharpoons [ML]$	25,89±0,06	25,89	27,51±0,07	27,51
$[ML] + H \rightleftharpoons [HLM]$	32,27±0,07	6,38	33,98±0,06	6,47
$[HLM] + H \rightleftharpoons [H_2LM]$	37,74±0,03	5,47	39,14±0,03	5,16
$[H_2LM] + H \rightleftharpoons [H_3LM]$	40,41±0,09	2,67	41,42±0,08	2,28
$[H_3LM] + H \rightleftharpoons [H_4LM]$	43,70±0,03	3,29	44,28±0,03	2,87

$$^a \beta_n = [H_nLM]/([H]^n[L][M])$$

Distribučné diagramy pre oba kovové ióny sú znázornené na *Obr. 4.3*. Diagramy sú si vzájomne veľmi podobné. Pri nižšom pH sa v roztoku v malom zastúpení nachádza častica $[MH_3L]$, t. j. intermediát – komplex „out-of-cage“, v ktorom je kovový ión

koordinovaný len donorovými atómami pendentných ramien a atómy dusíku makrocyklu sú protonizované (pH \sim 2,5 pre Lu a \sim 3 pre prípad Ce). V oblasti pH>3 začína v roztoku prevládať forma „in-cage“ komplexu $[\text{MH}_2\text{L}]^-$, kde je už ión kovu umiestnený v kavite ligandu, koordinovaný všetkými donorovými atómami. Pri pH \sim 7 je ligand už plne deprotonizovaný. Hodnoty disociačných konštánt sú nižšie ako pre voľný ligand H_6L , z dôvodu koordinácie fosfonátových skupín.



Obrázok 4.3 – Distribučný diagram komplexov H_6L s iónmi Ln^{3+} v závislosti na pH; **a.** Lu^{3+} ; **b.** Ce^{3+}
($c_{\text{L}} = c_{\text{M}} = 0,004 \text{ M}$; $I = 0,1 \text{ M (NMe}_4\text{)Cl}$, $25 \text{ }^\circ\text{C}$)

Získané hodnoty konštánt stability ukazujú, že dané komplexy sú stabilnejšie ako obdobné komplexy ligandu H₄dota, ale menej stabilné ako zodpovedajúce komplexy H₈dotp. Toto pozorovanie potvrdzuje trend, že viac bázičné ligandy tvoria stabilnejšie komplexy.^[3] Čo sa týka *trans*-izoméru ligandu H₆do2a2p, hodnota konštanty stability pre komplex s Lu³⁺ je nižšia ako pre komplex Lu-H₆L. Konštanta stability pre komplex s Ce³⁺ nie je v literatúre uvádzaná. Z uvedených hodnôt je tiež zrejmé, že dôležitým parametrom ovplyvňujúcim stabilitu komplexov je veľkosť iónu lantanoidu, so stabilitou komplexov rastúcou smerom od Ce³⁺ k Lu³⁺. Porovnávané hodnoty sú uvedené v Tab. 4.3.

Tabuľka 4.3 – porovnanie konštánt stability komplexov Ln–L a komplexov podobných ligandov

Ligand	Ce ³⁺	Lu ³⁺	Ref.
	Logβ _{ML}		
H ₆ L	25,89	27,51	Táto práca
H ₄ dota	24,6	25,4	[35],[19]
H ₆ do2a2p ^a	--	26,4	[19],[20]
H ₈ dotp	27,7	29,6	[36]

^a H₆do2a2p = *trans* izomér ligandu DO2A2P

4.2.3 Interakcie H₆L s vybranými iónmi prechodných kovov

Potenciometrickými titráciami boli určené hodnoty protonizačných konštánt a konštánt stability pre komplexy s iónmi Cu²⁺ a Zn²⁺. Titrácie boli vykonané v pomere kov:ligand 1:1 a 2:1. Získané hodnoty konštánt stability sú uvedené v Tab. 4.4. V komplexoch prechodných kovov môžu byť pendantné ramená nekoordinované, čo vedie k vyšším hodnotám disociačných konštánt oproti komplexom Ln³⁺ iónov, v ktorých sú koordinované všetky pendantné ramená. Rozdiely tiež môžu vznikáť v porovnaní s disociačnými konštantami voľného ligandu, u ktorého sú pravdepodobne pendantné ramená zapojené do siete silných vodíkových väzieb.

Tabuľka 4.4 – Protonizačné konštanty a zodpovedajúce celkové konštanty stability v systéme (Cu/Zn)–H₆L

Rovnováha	CuL		ZnL	
	logβ ^a	logK	Logβ	logK
M + L ⇌ [ML]	25,94±0,04	25,94	21,37±0,04	21,37
[ML] + H ⇌ [HLM]	33,21±0,04	7,26	29,60±0,03	8,23
[HLM] + H ⇌ [H ₂ LM]	39,39±0,04	6,18	36,01±0,03	6,41
[H ₂ LM] + H ⇌ [H ₃ LM]	42,86±0,03	3,45	40,46±0,02	4,45
[H ₃ LM] + H ⇌ [H ₄ LM]	45,22±0,04	2,36	43,04±0,02	2,58
[LM] + M ⇌ [LM ₂]	32,00±0,05	6,06	28,82±0,04	7,45
[LM ₂] + H ⇌ [HLM ₂]	37,91±0,04	5,91	35,63±0,03	6,81
[HLM ₂] + H ⇌ [H ₂ LM ₂]	41,77±0,07	3,86	39,87±0,03	4,24
[LM ₂ (OH)] + H ⇌ [LM ₂]	23,09±0,18	8,91	19,62±0,04	9,20
[LM ₂ (OH) ₂] + H ⇌ [LM ₂ (OH)]	14,71±0,09	8,38	9,36±0,05	10,26

$$^a \beta_n = [H_nLM]/([H]^n[L][M])$$

Komplexy ligandu H₆L s iónmi prechodných kovov sú vysoko termodynamicky stabilné. V prípade komplexu Cu-L je stabilita zrovnateľná so stabilitou komplexov Ln³⁺ iónov, zinočnaté katióny tvoria komplexy s nižšou hodnotou konštanty stability, poradie stability komplexov zodpovedá Irving-Williamsovej sérii.

V prípade titrácie H₆L s Cu²⁺ v pomere kov:ligand=1:1 pozorujeme vznik očakávanej častice [CuL]⁴⁺ pri pH>6, pri pH~8 je už v roztoku prevládajúcou časticou. Pri tomto titračnom pomere nebol pozorovaný vznik častíc s väčším počtom atómov Cu²⁺ na molekulu komplexu, ani vznik hydroxokomplexov. Zmena nastáva pri titrácii v pomere Cu:ligand=2:1, kedy je v nízkych oblastiach pH pozorovaný vznik rovnakých častíc ako pri titrácii v pomere Cu:L=1:1, no ich relatívne zastúpenie so zvyšujúcim sa pH klesá. Zároveň je ale pozorovaný vznik častíc [Cu₂H_nL]²⁻ⁿ. Pri pH ~7,5 dominuje v roztoku častica [Cu₂L]²⁻. V oblasti vyššieho pH pravdepodobne dochádza k vzniku hydroxokomplexov. Distribučné diagramy pre oba pomery sú znázornené na Obr. 4.4.

Pri sledovaní interakcie H₆L s iónmi Zn²⁺ pozorujeme vznik častíc typu [Zn₂H_nL]²⁻ⁿ už pri pomere Zn:L=1:1. Jedná sa však len o slabo zastúpené druhy v kyslej oblasti pH (pH~2–6, zastúpenie 5–10 %). V prípade titrácie v pomere Zn:L=2:1 začínajú častice typu [Zn₂H_nL]²⁻ⁿ naberať na význame rovnako ako v prípade titrácie Cu²⁺. V oblasti pH~6 prevláda monoprotonizovaná forma [Zn₂HL]⁻, pri pH~8 je to už plne

deprotonizovaná forma $[\text{Zn}_2\text{L}]^{2-}$. V oblasti vyššieho pH je v roztoku pozorovaný vznik hydroxokomplexov – $[\text{Zn}_2(\text{OH})\text{L}]^{3-}$ (maximálne zastúpenie pri pH~10) a neskôr $[\text{Zn}_2(\text{OH})_2\text{L}]^{4-}$ (pri pH~12 cca 85 %). Distribučné diagramy pre oba titračné pomery sú znázornené na Obr. 4.4.

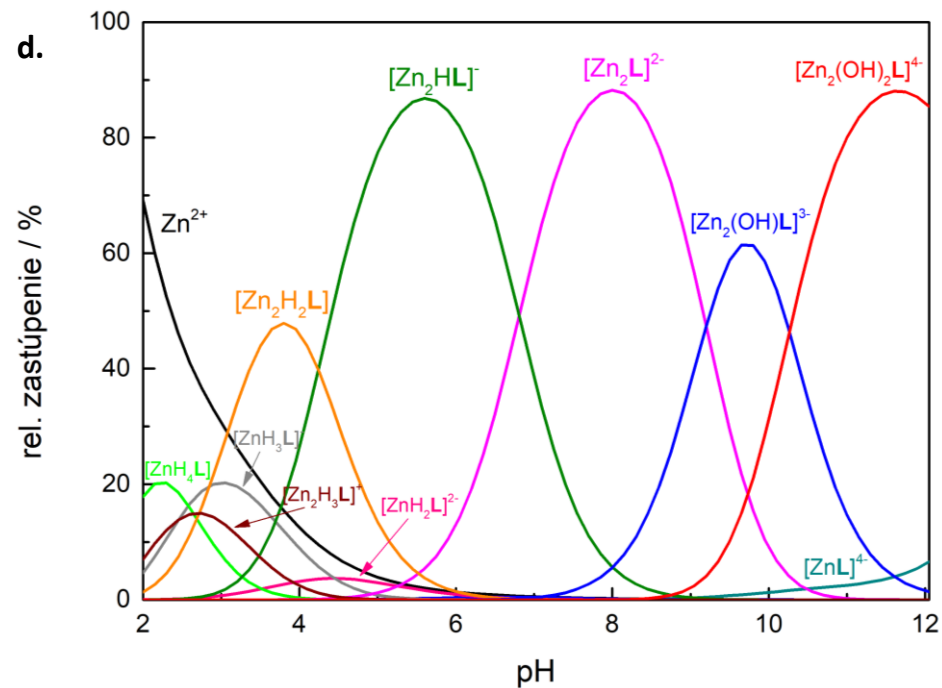
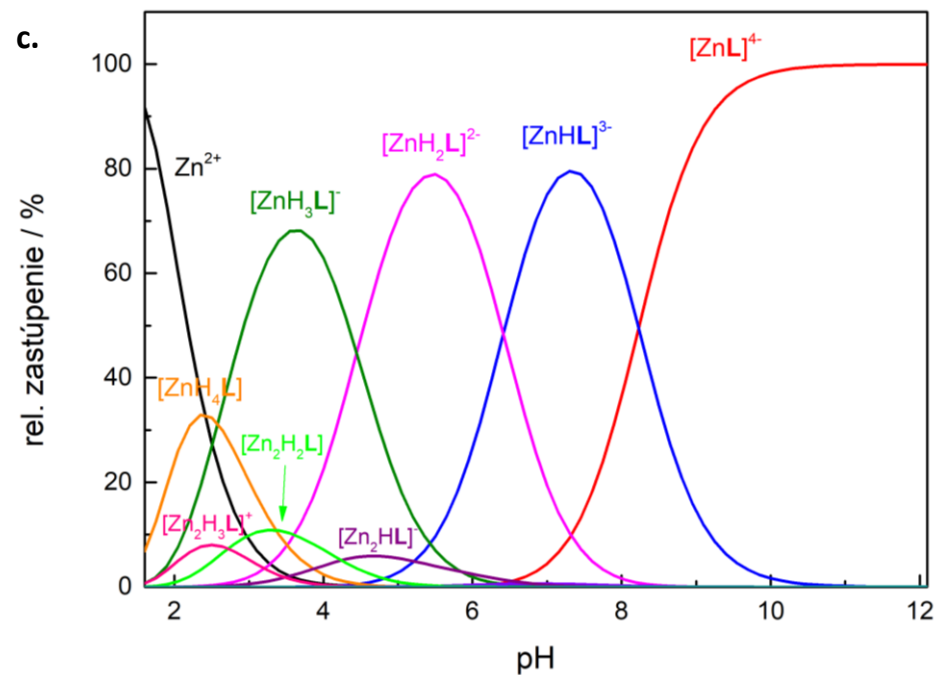
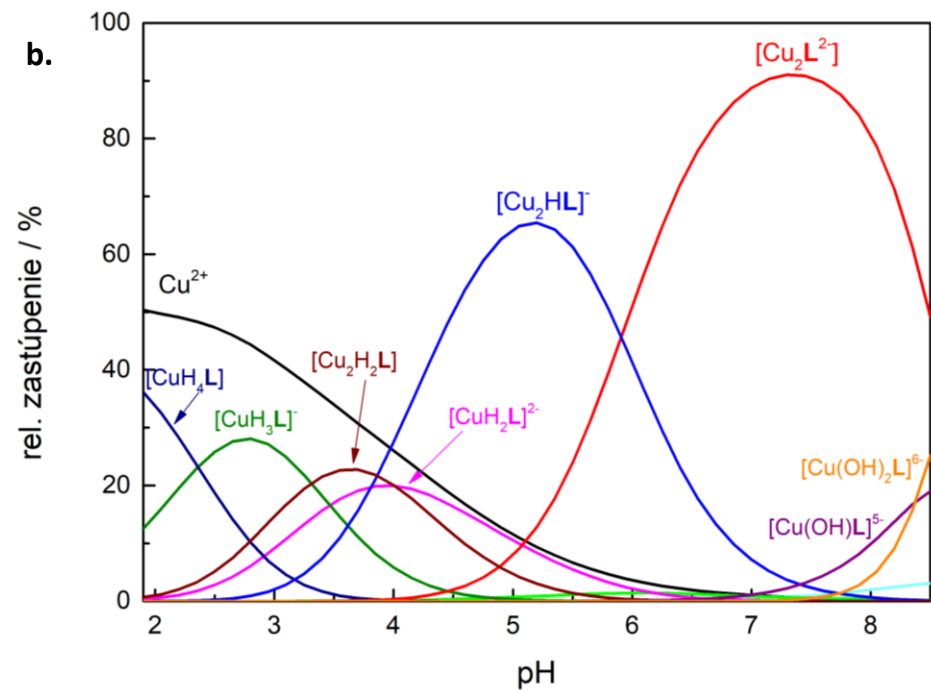
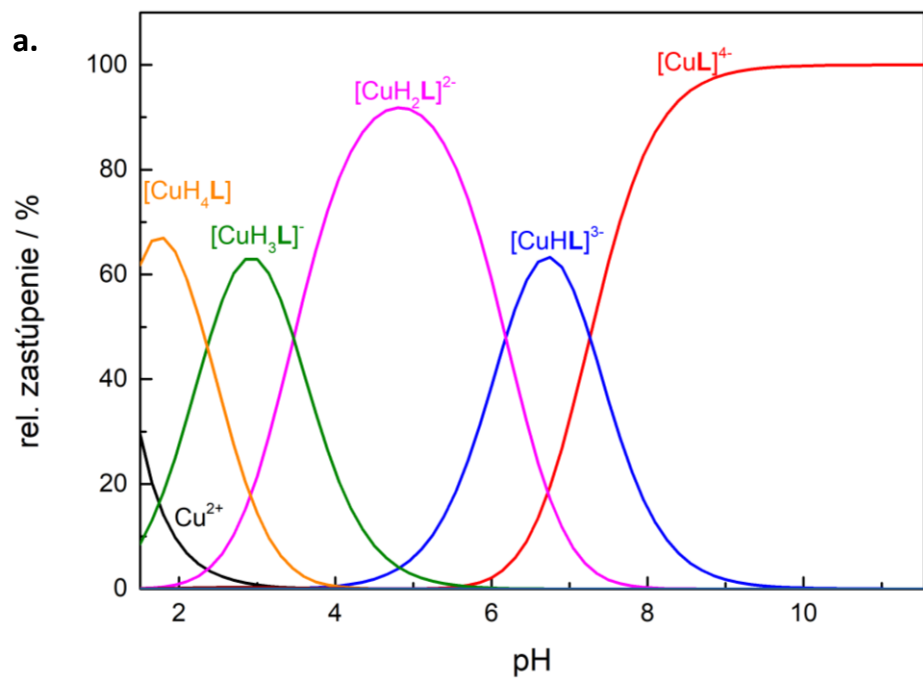
Hodnoty konštant stability komplexov H_6L s iónmi Cu^{2+} a Zn^{2+} v pomere kov:ligand=1:1 boli porovnané s obdobnými komplexmi príbuzných ligandov. Hodnoty sú zhrnuté v Tab. 4.5.

Tabuľka 4.5 - porovnanie konštant stability komplexov CuL a ZnL a komplexov podobných ligandov

Ligand	Cu ²⁺	Zn ²⁺	Ref.
	Logβ _{ML}		
H ₆ L	25,9	21,4	Táto práca
H ₄ dota	22,3	20,8	[37]
H ₆ do2a2p ^a	25,2	23,3	[20]
H ₈ dotp	25,4	24,8	[38],[19]

^a $\text{H}_6\text{do2a2p}$ = *trans* izomér ligandu DO2A2P

Podľa hodnôt uvedených Tab. 4.5 je zjavné, že komplexy H_6L s vybranými iónmi prechodných kovov sú podľa očakávania stabilnejšie ako analogické komplexy H_4dota . Komplex H_6L s iónmi Cu^{2+} je mierne stabilnejší ako med'natý komplex *trans*- $\text{H}_6\text{do2a2p}$, u komplexu so Zn^{2+} je situácia opačná. Pozoruhodná je vyššia stabilita komplexu Cu-L oproti analogickému komplexu ligandu H_8dotp . Toto pozorovanie sa vymyká trendu očakávanej vyššej stability kovových komplexov bázejších ligandov, rozdiel je však malý a mohol byť spôsobený rozdielmi v postupe merania.

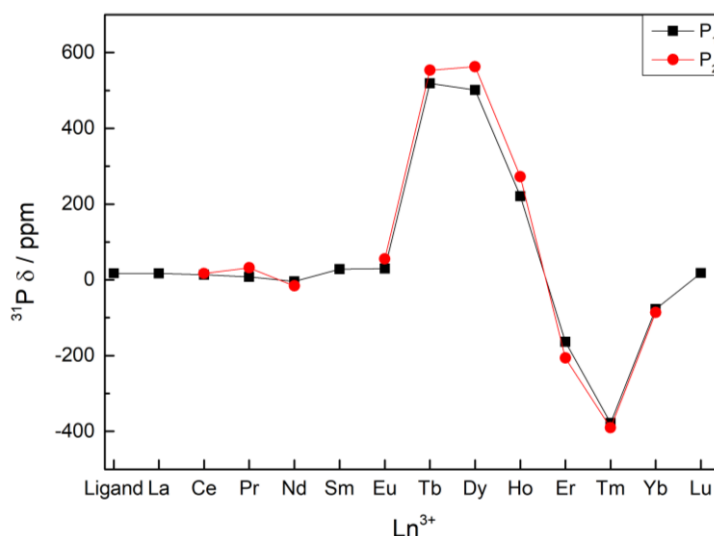


Obrázok 4.4 – distribučné diagramy pre systém Cu- H_6L : pomer Cu:L=1:1 (**a.**) a Cu:L=2:1 (**b.**) a systém Zn- H_6L : pomer Zn:L=1:1 (**c.**) a Zn:L=2:1 (**d.**)
($c_L = 0,004 \text{ M}$; $I = 0,1 \text{ M}$ (NMe_4)Cl, 25°C)

4.3 NMR štúdie komplexov Ln-L

Bolo pripravených 13 komplexov ligandu *cis*-DO2A2P s iónmi lantanoidov (okrem komplexov s iónmi Pm a Gd). Z každého komplexu bolo zmerané ^1H a ^{31}P NMR spektrum (300 MHz / 121 MHz; 25 °C). Molekula ligandu obsahuje 24 protónov, a po zakomplexovaní má symetriu C_1 . Z toho vyplýva, že všetkých 24 protónov je neekvivalentných, a ^1H NMR spektrá komplexov paramagnetických iónov by preto mali vykazovať 24 signálov (pre jeden izomér). Nie je tomu ale tak vo všetkých prípadoch, v niektorých z týchto spektier je prítomný menší počet rôznych rezonancií (21–23). Dôvodom môže byť to, že vplyvom posunu indukovaného prítomnosťou paramagnetického centra sú niektoré signály atómov vodíka prekryté intenzívnym signálom vody, prípadne signálmi zvyškového voľného ligandu.

Ako bolo spomenuté v úvode, komplexy DOTA-like ligandov vykazujú v roztoku dva rôzne izoméry - SA a TSA (prípadne ich dehydratované analógy, kap. 1.2.2) – v rôznom pomere pre rôzne Ln^{3+} ióny. Tieto izoméry poskytujú v NMR spektrách dve série signálov. V prípade komplexov ligandu *cis*-DO2A2P však bola pozorovaná len jedna séria signálov, a to v spektrách všetkých Ln^{3+} iónov. Je preto pravdepodobné, že všetky komplexy sú v roztoku prítomné len vo forme izoméru TSA (príp. TSA'). Táto myšlienka je podporovaná aj vzhľadom ^{31}P NMR spektier. Dva atómy fosforu v molekule ligandu sa po zakomplexovaní stávajú neekvivalentnými – jedno pendantné rameno je pootočené smerom ku acetátovej skupine, zatiaľ čo druhé smeruje k fosfonátovej skupine. Lantanoidové komplexy celej série (okrem diamagnetických iónov La^{3+} a Lu^{3+} a iónu Sm^{3+}) poskytujú v ^{31}P NMR spektre 2 signály s totožnou intenzitou. Posuny jadier ^{31}P pre jednotlivé komplexy ukazuje Obr. 4.5.



Obrázok 4.5 – posuny jadier ^{31}P v komplexoch $[\text{Ln}(\text{H}_2\text{O})_9\text{L}]^{3-}$ v závislosti na centrálnom ióne (121 MHz, D_2O , pH 8-11)

Vzhľadom na to, že vzájomná intenzita týchto dvoch ^{31}P signálov sa nemení pri žiadnom z komplexov, bolo usúdené, že nedochádza k zmene izomérie. Teoreticky je možné, že komplexy najväčších iónov Ln^{3+} (La^{3+} , Ce^{3+} , Pr^{3+}) sa môžu minoritne nachádzať aj vo forme izoméru SA, no pri intenzite použitého magnetického poľa a teplote merania neboli ich signály pozorované. ^1H NMR a vybrané ^{31}P spektrá komplexov paramagnetických iónov Ln^{3+} s H_6L sú uvedené v časti 6 (Príloha).

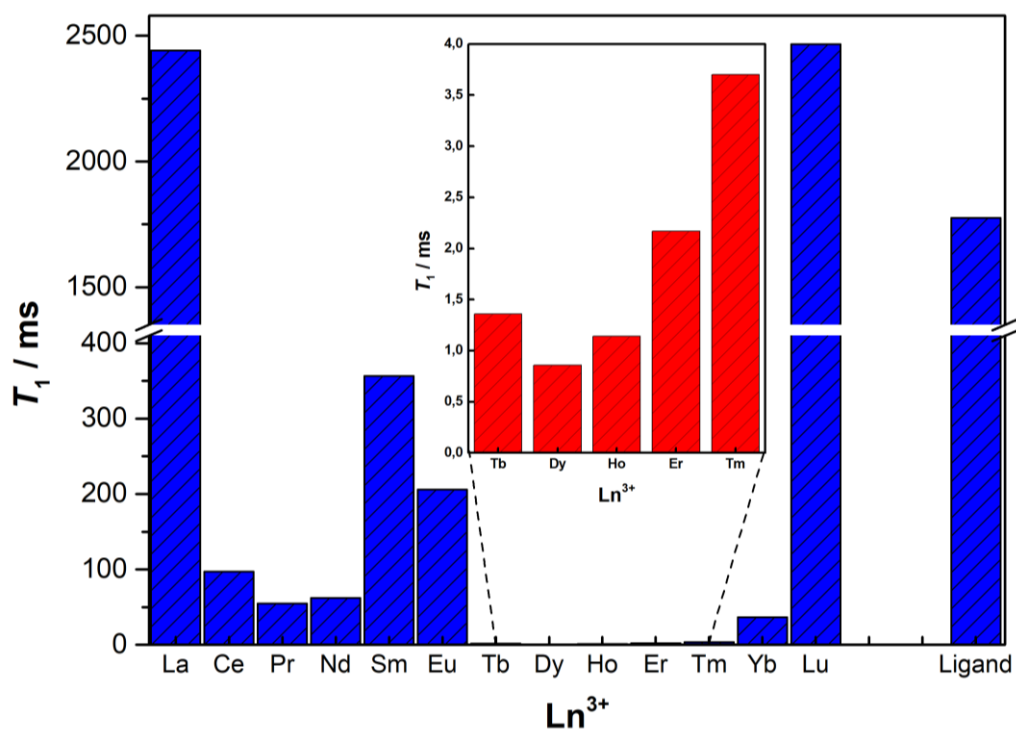
4.3.1 Meranie T_1 a T_2^* relaxačných časov komplexov Ln-L

Pre každý z pripravených komplexov bol zmeraný relaxačný čas T_1 jadier ^{31}P . Na meranie bola použitá metóda „Inversion recovery“. Pre každé meranie bol kalibrovaný pulz. Relaxačný čas T_2^* bol pre jednotlivé paramagnetické komplexy získaný z pološírky signálov ^{31}P ($T_2^* = 1/\pi\nu_{1/2}$). Výsledné relaxačné časy sú zhrnuté v Tab. 4.6.

Tabuľka 4.6 – Chemické posuny ^{31}P a relaxačné časy komplexov Ln-L (121 MHz, D_2O)

Ln^{3+}	$^{31}\text{P} \delta / \text{ppm}$	T_1 / ms	T_2^* / ms	T_2^*/T_1
La	16,86	2442	11,78	0,005
Ce	16,97	97,26	8,96	0,092
	13,41	96,26	9,09	0,094
Pr	32,06	54,93	6,98	0,127
	7,92	55,69	6,19	0,111
Nd	-4,14	62,19	9,05	0,146
	-16,16	64,59	8,56	0,133
Sm	28,12	356,7	9,23	0,026
Eu	55,67	205,8	4,60	0,022
	30,03	200,9	2,75	0,014
Tb	553,4	1,362	0,95	0,698
	518,9	1,416	1,10	0,780
Dy	562,5	0,857	0,64	0,744
	500,8	0,926	0,68	0,732
Ho	272,6	1,143	0,89	0,783
	217,8	1,273	0,98	0,768
Er	-163,7	2,167	1,50	0,692
	-206,3	2,178	1,53	0,704
Tm	-377,7	3,704	2,51	0,678
	-390,2	3,559	2,23	0,626
Yb	-77,13	36,67	8,92	0,243
	-86,22	33,18	8,84	0,266
Lu	18,06	2467	17,12	0,007
Ligand	17,47	1775	61,96	0,035

Po koordinácii paramagnetických iónov Ln^{3+} k molekule ligandu dochádza k viac či menej významnému skracovaniu relaxačných časov jadier ^{31}P . Táto zmena je najviac výrazná u komplexu iónu Dy^{3+} , ktorého hodnota relaxačného času T_1 je takmer 2000-krát menšia ako pre voľný ligand. Na druhú stranu, u komplexov diamagnetických iónov La^{3+} a Lu^{3+} dochádza oproti voľnému ligandu k predĺženiu relaxačných časov. Graficky tieto zmeny ilustruje Obr. 4.6.



Obrázok 4.6 – dĺžka T_1 relaxačného času v závislosti na druhu Ln^{3+} iónu

4.4 UV-Vis štúdium kinetiky disociácie komplexu Ce-L

Disociácia lantanoidových komplexov je popísaná nasledovne:

$$-\frac{d[\text{LnL}]}{dt} = {}^d k_{\text{obs}}[\text{LnL}]_{\text{tot}} \quad (7)$$

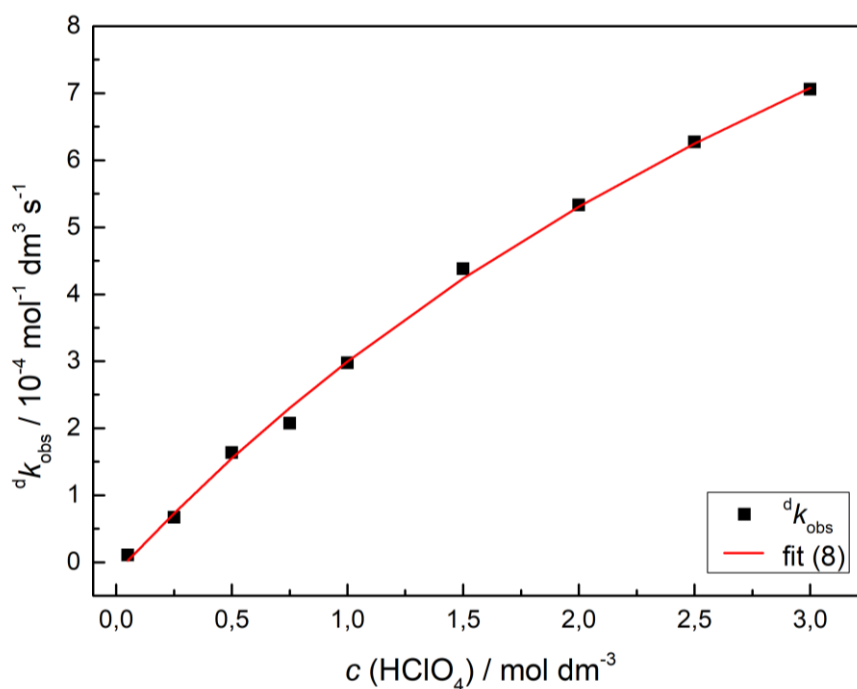
kde ${}^d k_{\text{obs}}$ je rýchlostná konštanta disociácie. Táto rýchlostná konštanta je pseudo-prvého poriadku, pretože $[\text{H}^+] \gg [\text{LnL}]$. Podľa akceptovaného reakčného mechanizmu disociácie lantanoidových komplexov ligandov odvodených od DOTA sú na začiatku v rýchlej reakcii protonizované pendantné ramená. Táto protonizácia je nasledovaná rýchlosť určujúcim krokom spojeným s prenosom protónu na atóm dusíku makrocyclu. Súčasne je rozštiepená väzba Ln–N za vzniku intermediátového komplexu $[\{\text{Ln}-(\text{H}_n\text{L})\}^*]^{x+}$. Tento proces nasleduje rýchle rozštiepenie ostatných koordinačných väzieb a simultánna protonizácia iných aminoskupín, čo vedie k disociácii komplexu. Podľa zistených disociačných konštánt a distribučných diagramov komplexov Ln-H₆L je pri pH~3 najviac zastúpenou časticou stabilný diprotonizovaný komplex $[\text{LnH}_2\text{L}]^-$, v ktorom sa nachádza jeden protón na každom fosfonátovom pendantnom ramene. Ďalšou protonizáciou (alebo viacerými) je vytvorená kineticky aktívna častica, ktorá následne disociuje. Rýchlostná konštanta takejto disociácie je v literatúre bežne popisovaná rovnicou kyslej disociácie (8):

$${}^d k_{\text{obs}} = \frac{{}^d k_0 + {}^d k_1 K[\text{H}^+]}{1 + K[\text{H}^+]} = \frac{{}^d k_0 + k_{\text{H}}[\text{H}^+]}{1 + K[\text{H}^+]} \quad (8)$$

kde K je protonizačná konštanta pre vznik prvej kineticky aktívnej častice a ${}^d k_0$ a ${}^d k_1$ sú rýchlostné konštanty spontánnej a ďalej protónom-indukovanej disociácie.^{[17]–[20]}

Závislosť pozorovanej rýchlostnej konštanty disociácie na koncentrácii H^+ a zodpovedajúci fit podľa rovnice (8) zobrazuje Obr. 4.7. Hodnoty pozorovaných rýchlostných konštánt získané z rovnice (6) boli následne zavedené do rovnice (8). Boli získané hodnoty K , ${}^d k_1$ a k_{H} , hodnota ${}^d k_0$ bola kvôli pomalej spontánnej disociácii zanedbaná.

Získané hodnoty boli porovnávané s Ce^{3+} komplexmi podobných ligandov. Dané údaje sú zhrnuté v Tab. 4.7.



Obrázok 4.7 – závislosť pozorovanej disociačnej konštanty komplexu CeL na koncentrácii H^+ a fit zodpovedajúci rovnici (8) ($25\text{ }^{\circ}\text{C}$, $I = 3,0\text{ M}$ (Na,H)ClO₄)

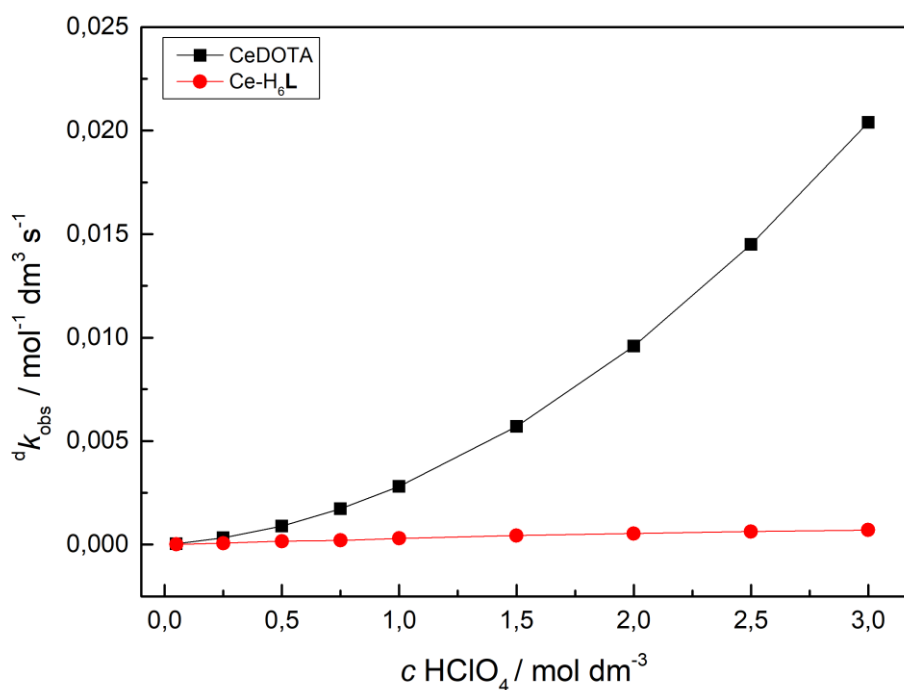
Tabuľka 4.7 – kinetické parametre pre kyslú dekomplexáciu Ce-H₆L a porovnanie pre Ce³⁺ komplexy podobných ligandov ($25\text{ }^{\circ}\text{C}$, $I = 3,0\text{ M}$ (Na,H)ClO₄)

Ligand	$k_H (=^d k_1 \cdot K)$ / $10^{-4}\text{ M}^{-1}\text{ s}^{-1}$	K / M^{-1}	$^d k_1 / 10^{-4}\text{ s}^{-1}$	$^d k_{\text{obs}} / 10^{-6}\text{ s}^{-1}$ ($[H^+] = 0,01\text{ M}$)	$^d k_{\text{obs}} / 10^{-4}\text{ s}^{-1}$ ($[H^+] = 3\text{ M}$)	Ref.
H ₆ L	$3,7 \pm 0,2$	$0,18 \pm 0,03$	20	3,7	7,1	Táto práca
H ₄ dota	8	--	--	8,2	204	[39]
H ₅ do3ap	12,2	--	--	12	36,6	[16]
H ₆ do2a2p ^a	$3,5 \pm 0,1$	$0,19 \pm 0,02$	18	3,5	6,71	[20]
H ₇ doa3p	2,4	0,92	3,0	2,4	1,91	[17]
H ₈ dotp	0,46	$3,3^b$	--	0,46	1,18	[40]

^aH₆do2a2p = *trans* izomér ligandu DO2A2P; ^b50 °C

Z hodnôt uvedených v Tab. 4.7 vyplýva, že Ce³⁺ komplex H₆L je výrazne viac kineticky inertný ako zodpovedajúci komplex H₄dota a H₅do3ap, no menej inertný ako Ce³⁺ komplexy H₇doa3p a H₈dotp. Porovnanie rýchlosti dekomplexácie Ce-H₆L a Ce-H₄dota je graficky znázornené na Obr. 4.8. Toto pozorovanie je opäť v súlade s inertnosťou komplexov v rámci série ligandov odvodených od DOTA so zmiešanými acetátovými/fosfonátovými pendantnými ramenami. Pre *trans*-H₆do2a2p boli získané

parametre s veľmi podobnými hodnotami. Výrazná odlišnosť disociačných parametrov (k_H) medzi ceritými komplexmi H_6L i *trans*- $H_6do2a2p$ a H_4dota je pravdepodobne spôsobená veľkosťou iónu Ce^{3+} . Ten je schopný tvoriť nona-koordinované komplexy aj s tetra-fosforovými analógmi DOTA.^[41] Keďže je deviate koordinačné miesto pravdepodobne obsadené molekulou vody, ktorá sa môže zúčastňovať v sieti vodíkových väzieb s fosfonátovými skupinami, prístup protónu k diprotonizovanej častici je sčasti blokovaný a formácia kineticky aktívnej častice $[LnH_nL]$ je sťažená. Po pristúpení tohto protónu je ale dekomplexácia rýchlejšia ako u ostatných ligandov ($^d k_1$). Pre komplexy väčších iónov Ln^{3+} (Eu^{3+} , Tb^{3+}) ligandov $H_6do2a2p$ a H_8dotp , ktoré neobsahujú priamo koordinovanú molekulu vody, je prístup protónu potrebného na vytvorenie kineticky aktívnej častice jednoduchší, sú preto kineticky menej inertné.^[20]



Obrázok 4.8 – porovnanie pozorovanej rýchlostnej konštanty pre $Ce-H_6L$ a $Ce-H_4dota$ v závislosti na koncentrácii H^+ .
(krivka pre $Ce-H_4dota$ bola vypočítaná z dát dostupných v literatúre ^[43])

5 Záver

V rámci tejto diplomovej práce bol syntetizovaný ligand *cis*-DO2A2P, jeho komplexy s trojmocnými iónmi lantanoidov a bolo vykonané štúdium vlastností týchto komplexov v roztoku.

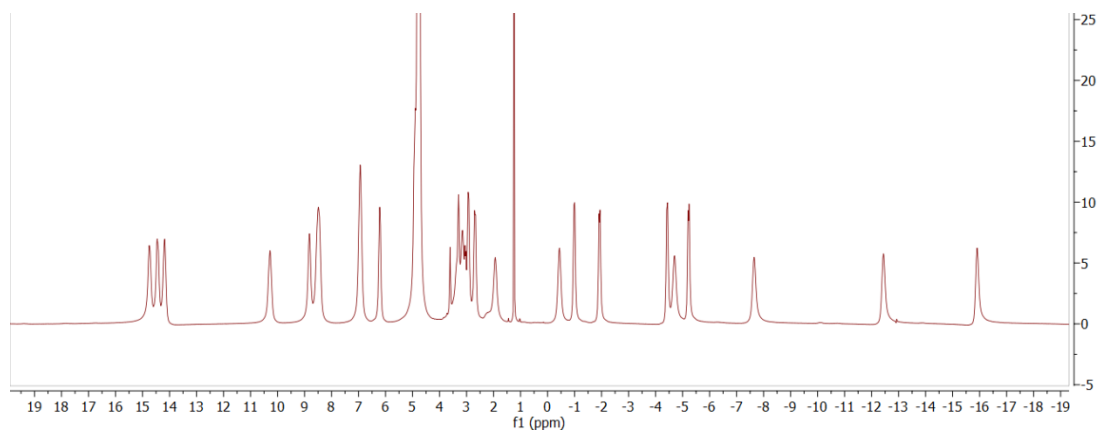
Potenciometrickými titraciami boli získané konštanty stability pre komplexy Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ce^{3+} a Lu^{3+} . Hodnoty konštant stability komplexov vo všeobecnosti zapadajú do trendu série ligandov DOTA-DOTP, t. j. komplexy Ln^{3+} iónov, rovnako ako komplexy iónov prechodných kovov ligandu *cis*-DO2A2P sú stabilnejšie ako zodpovedajúce komplexy DOTA, ale menej stabilné ako komplexy DOTP. Pri porovnaní s komplexmi ligandu *trans*-DO2A2P sú získané hodnoty zrovnateľné.

Boli získané ^1H a ^{31}P NMR spektrá pre celú sériu komplexov ligandu H_6L s iónmi Ln^{3+} . Uvedené komplexy vykazujú podľa vykonaných NMR meraní pozdĺž celej série štruktúrnu izomériu TSA. Pre každý komplex bola získaná hodnota relaxačných časov T_1 a T_2^* , ktoré sú podľa očakávaní pre komplexy s paramagnetickými iónmi kovov výrazne skrátené oproti diamagnetickým analógom i voľnému ligandu.

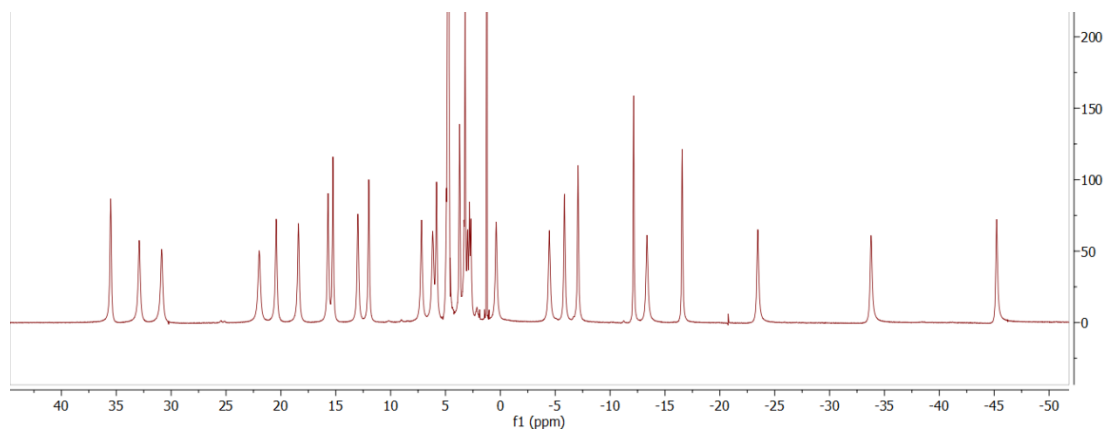
Pomocou UV-Vis meraní bola sledovaná kinetika disociácie ceritého komplexu *cis*-DO2A2P. Bolo zistené, že daný komplex je kineticky inertnejší ako analogický komplex Ce-DOTA, no menej kineticky inertný ako komplex Ce-DOTP. Hodnoty získaných disociačných parametrov boli veľmi podobné ako tie získané pre Ce^{3+} komplex ligandu *trans*-DO2A2P.

6 Príloha

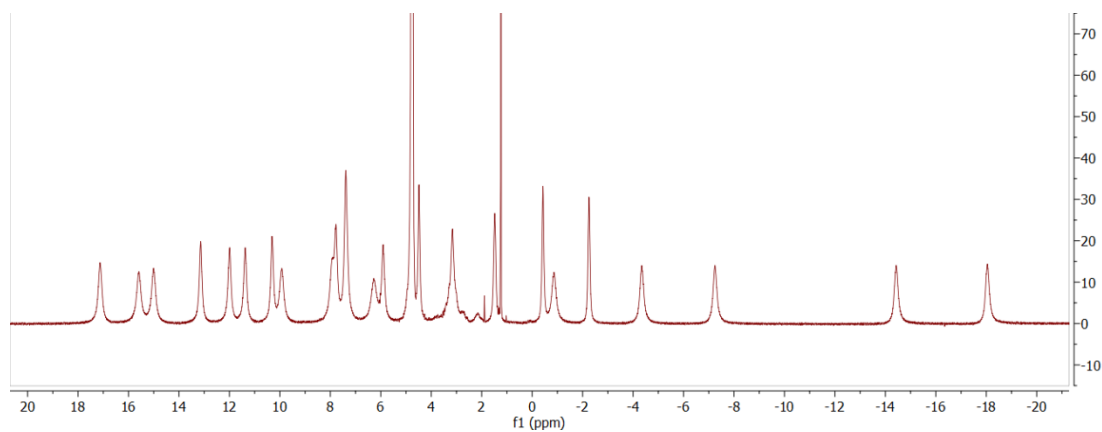
^1H NMR spektrá komplexov ligandu H_6L s paramagnetickými iónmi Ln^{3+}



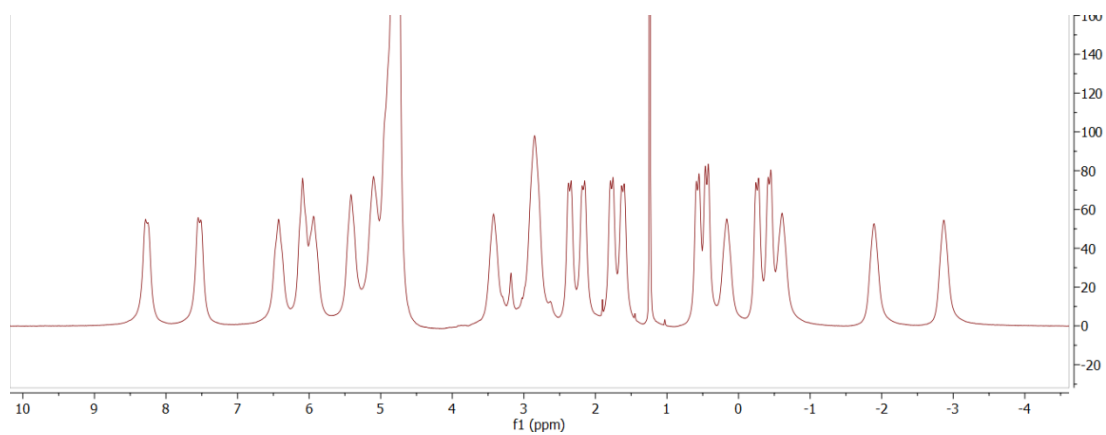
Obrázok 6.1 – ^1H NMR spektrum CeL (300 MHz; 25 °C; pD 7,8; D_2O)



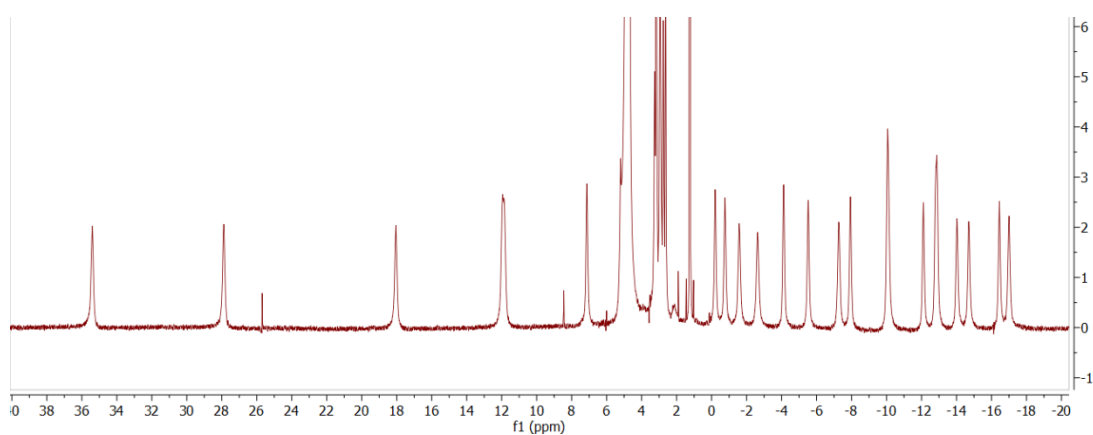
Obrázok 6.2 – ^1H NMR spektrum PrL (300 MHz; 25 °C; pD 9,83; D_2O)



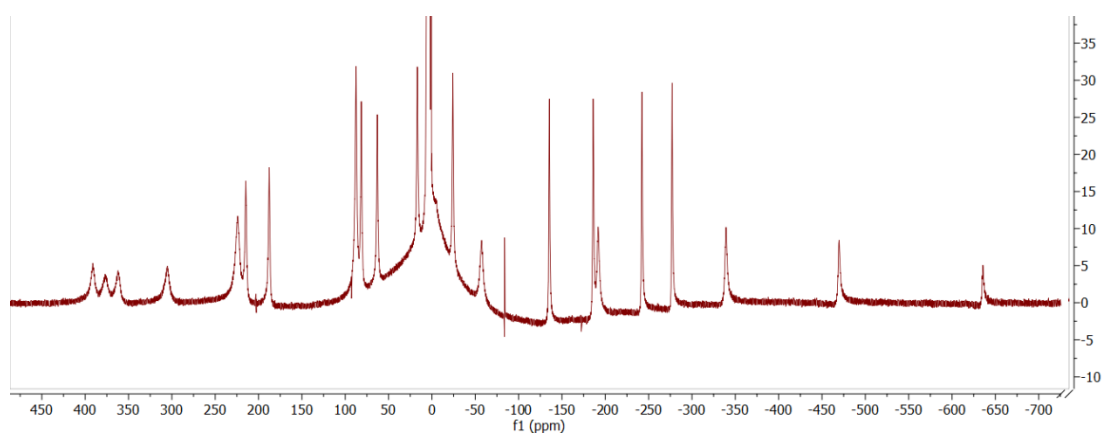
Obrázok 6.3 – ^1H NMR spektrum NdL (300 MHz; 25 °C; pD 9,3; D_2O)



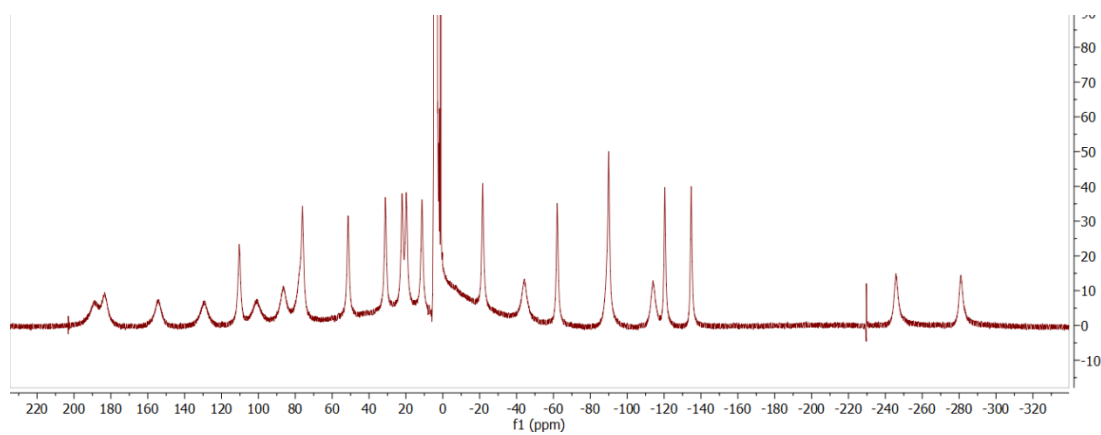
Obrázok 6.4 – ^1H NMR spektrum SmL (300 MHz; 25 °C; pD 10,44; D_2O)



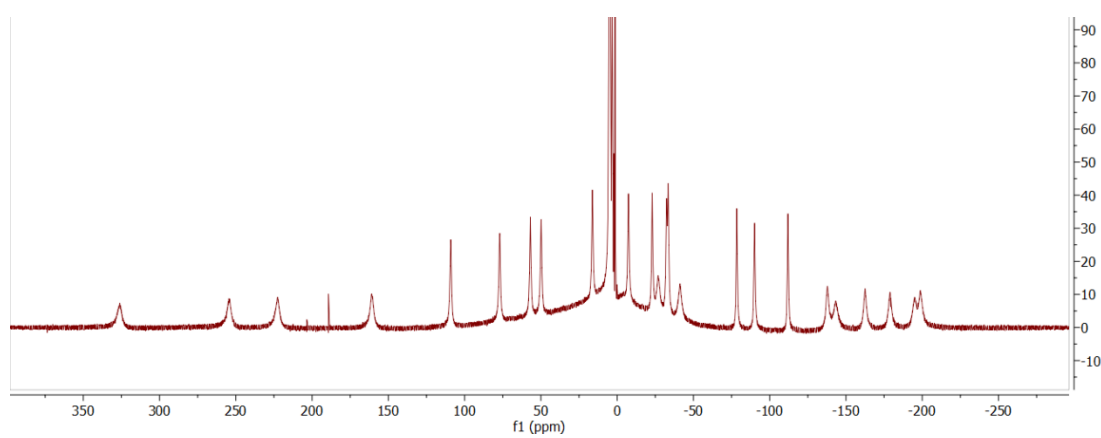
Obrázok 6.5 – ^1H NMR spektrum EuL (300 MHz; 25 °C; pD 10,5; D_2O)



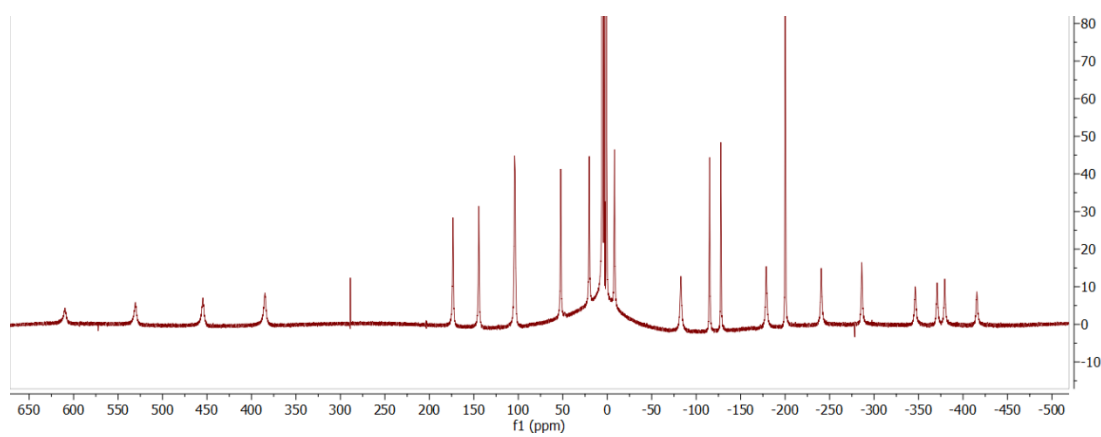
Obrázok 6.6 – ^1H NMR spektrum DyL (300 MHz; 25 °C; pD 10,1; D_2O)



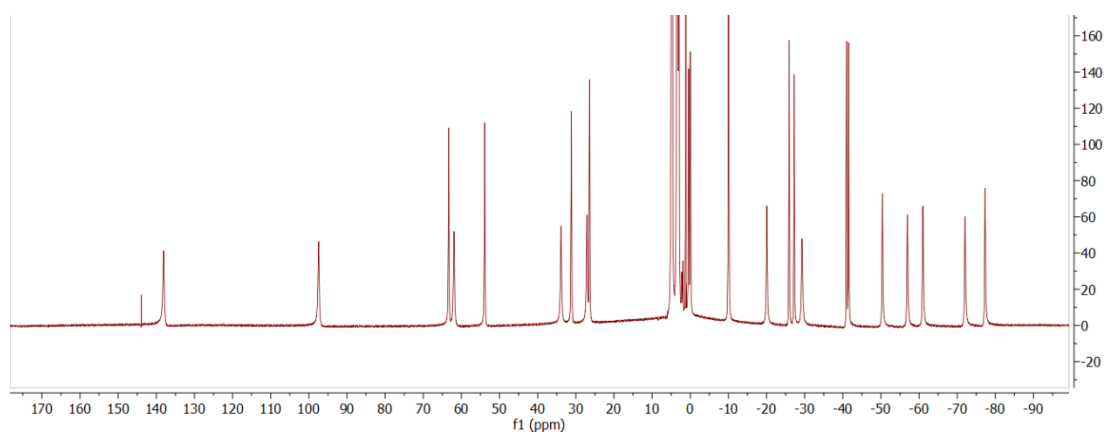
Obrázok 6.7 – ^1H NMR spektrum HoL (300 MHz; 25 °C; pD 8,14; D_2O)



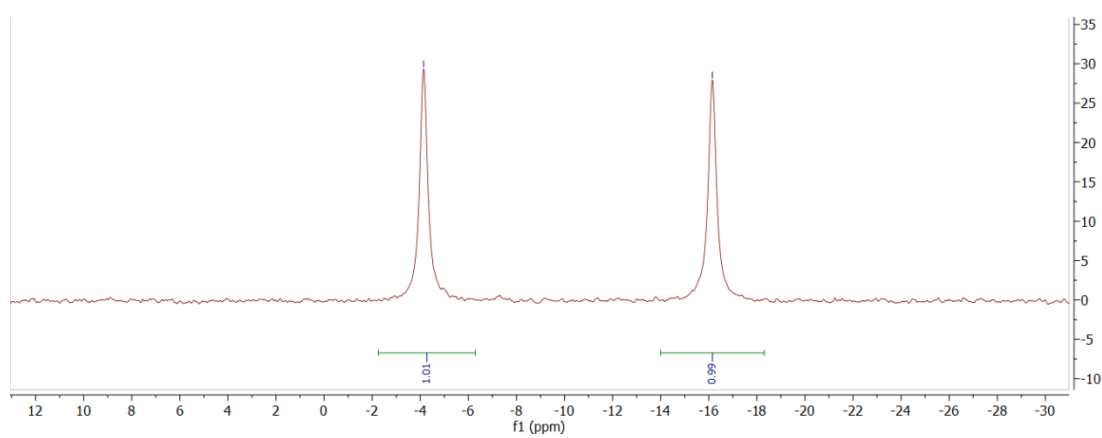
Obrázok 6.8 – ^1H NMR spektrum ErL (300 MHz; 25 °C; pD 9,67; D_2O)



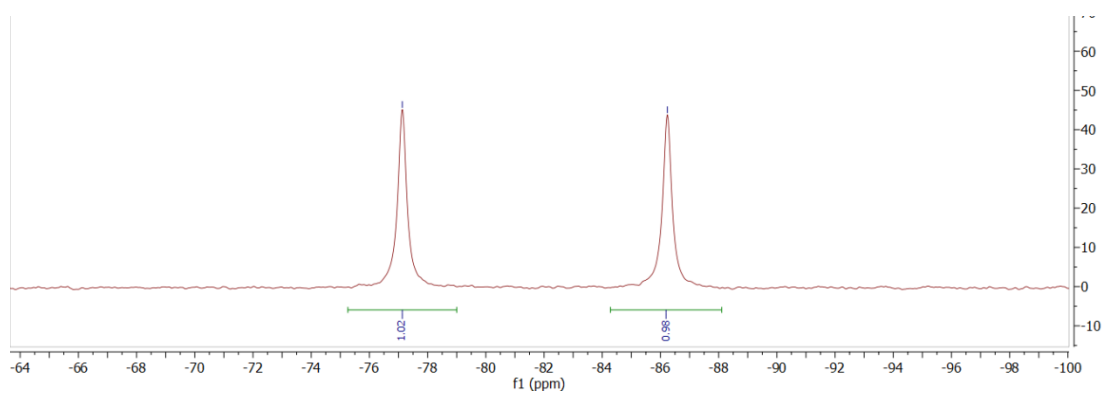
Obrázok 6.9 – ^1H NMR spektrum TmL (300 MHz; 25 °C; pD 8; D_2O)



Obrázok 6.10 – ^1H NMR spektrum YbL (300 MHz; 25 °C; pD 8,2; D_2O)



Obrázok 6.11 – ^{31}P NMR spektrum NdL (121 MHz; 25 °C; pD 9,3; D_2O)



Obrázok 6.12 – ^{31}P NMR spektrum YbL (121 MHz; 25 °C; pD 8,2; D_2O)

7 Zoznam použitých skratiek

Bn	Benzyl
DCM	Dichlórmétán
DMF	Dimetylformamid
DO2A	1,4,7,10-tetraazacyklododekán-1,4-dioctová kyselina
DO2A2P	1,4,7,10-tetraazacyklododekán-4,10-bis(karboxymetyl)-1,7-bis(metylfosfónová) kyselina (<i>trans</i>) / 1,4,7,10-tetraazacyklododekán-7,10-bis(karboxymetyl)-1,4-bis(metylfosfónová) kyselina (<i>cis</i>)
DO3AP	1,4,7,10-tetraazacyklododekán-4,7,10-tris(karboxymetyl)-1-(metylfosfónová) kyselina
DOA3P	1,4,7,10-tetraazacyklododekán-10-(karboxymetyl)-1,4,7-tris(metylfosfónová) kyselina
DOTA	1,4,7,10-tetraazacyklododekán-1,4,7,10-tetraoctová kyselina
DOTP	1,4,7,10-tetraazacyklododekán-1,4,7,10-tetrakis(metylfosfónová) kyselina
Et	etyl
<i>i</i>-Pr	izopropyl
LIR	Lanthanide Induced Relaxation rate / lantanoidmi indukovaná relaxácia
LIS	Lanthanide Induced Shift / lantanoidmi indukovaný posun
Me	metyl
MeCN	acetonitril
MION	Microcrystalline Iron Oxide Nanoparticles /
MRI	Magnetic Resonance Imaging / zobrazovanie magnetickou rezonanciou
MS	Mass Spectroscopy / hmotnostná spektrometria
NMR	Nuclear Magnetic Resonance / nukleárna magnetická rezonancia
R_f	retenčný faktor
RT	Room Temperature / izbová teplota
RVO	Rotačná vákuová odparka
SA	Square Antiprism / štvorcové antiprizma
SPIO	Small Superparamagnetic Iron Oxides
TACN	1,4,7-triazacyklononán
<i>t</i>-Bu	terc-butyl
TFA	kyselina trifluóroctová
THF	tetrahydrofurán
TLC	Thin Layer Chromatography / Chromatografia na tenkej vrstve
TMS	tetrametylsilán
TSA	Twisted Square Antiprism / Skrútené štvorcové antiprizma

8 Zoznam použitej literatúry

- [1] Melson, G. A. *Coordination Chemistry of Macrocyclic Compounds*. (Plenum Press, 1979).
- [2] Cabbiness, D. K. & Margerum, D. W. "Macrocyclic Effect on the Stability of Copper(II) Tetramine Complexes". *J. Am. Chem. Soc.* 6540–6541 (1969).
- [3] Lukeš, I., Kotek, J., Vojtíšek, P. & Hermann, P. "Complexes of tetraazacycles bearing methylphosphinic/phosphonic acid pendant arms with copper(II), zinc(II) and lanthanides(III). A comparison with their acetic acid analogues". *Coord. Chem. Rev.* **216–217**, 287–312 (2001).
- [4] Kotek, J. & Lukeš, I. "Cheláty pro využití v biomedicínských oborech". *Chem. List.* **104**, 1163–1174 (2010).
- [5] Aime, S. *et al.* "Conformational and Coordination Equilibria on DOTA Complexes of Lanthanide Metal Ions in Aqueous Solution Studied by ^1H -NMR Spectroscopy". *Inorg. Chem.* **36**, 2059–2068 (1997).
- [6] Hermann, P., Kotek, J., Kubíček, V. & Lukeš, I. "Gadolinium(III) complexes as MRI contrast agents: ligand design and properties of the complexes". *Dalt. Trans.* **0**, 3027–3047 (2008).
- [7] Aime, S. *et al.* "A Novel Compound in the Lanthanide(III) DOTA Series. X-ray Crystal and Molecular Structure of the Complex $\text{Na}[\text{La}(\text{DOTA})\text{La}(\text{HDOTA})]\cdot 10\text{H}_2\text{O}$ ". *Inorg. Chem.* **36**, 4287–4289 (1997).
- [8] Benetollo, F., Bombieri, G., Calabi, L., Aime, S. & Botta, M. "Structural Variations Across the Lanthanide Series of Macrocyclic DOTA Complexes: Insights into the Design of Contrast Agents for Magnetic Resonance Imaging". *Inorg. Chem.* **42**, 148–157 (2003).
- [9] Avecilla, F., Peters, J. A. & Geraldes, C. F. G. C. "X-ray Crystal Structure of a Sodium Salt of $[\text{Gd}(\text{DOTP})]^{5-}$: Implications for Its Second-Sphere Relaxivity and the ^{23}Na NMR Hyperfine Shift Effects of $[\text{Tm}(\text{DOTP})]^{5-}$ ". *Eur. J. Inorg. Chem.* 4179–4186 (2003).
- [10] Kotková, Z. *et al.* "Lanthanide(III) Complexes of Phosphorus Acid Analogues of H_4DOTA as Model Compounds for the Evaluation of the Second-Sphere Hydration". *Eur. J. Inorg. Chem.* 119–136 (2009).
- [11] Pereira, G. A., Ball, L., Sherry, A. D., Peters, J. A. & Geraldes, C. F. G. C. "NMR characterization of lanthanide(3+) complexes of tetraazatetrakisphosphinato and tetraazatetrakisphosphonato ligands". *Helv. Chim. Acta* **92**, 2532–2551 (2009).
- [12] Botta, M. "Second Coordination Sphere Water Molecules and Relaxivity of Gadolinium(III) Complexes: Implications for MRI Contrast Agents". *Eur. J. Inorg. Chem.* 399–407 (2000).
- [13] Aime, S., Botta, M., Terreno, E., Anelli, P. L. & Uggeri, F. " $\text{Gd}(\text{DOTP})'$ -Outer-Sphere Relaxation Enhancement Promoted by Nitrogen Bases". *Magn. Reson. Med.* **30**, 583–591 (1993).
- [14] Aime, S., Barge, A., Botta, M., De Sousa, A. S. & Parker, D. "Direct NMR Spectroscopic Observation of a Lanthanide-Coordinated Water Molecule whose Exchange Rate Is Dependent on the Conformation of the Complexes". *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **37**, 2673–2675 (1998).
- [15] Rudovský, J. *et al.* "Lanthanide(III) complexes of a mono(methylphosphonate) analogue of H_4dota : The influence of protonation of the phosphonate moiety on the TSAP/SAP isomer ratio and the water exchange rate". *Chem. Eur. J.* **11**, 2373–2384 (2005).

- [16] Táborský, P. *et al.* "Thermodynamic and Kinetic Studies of Lanthanide(III) Complexes with H₅do3ap (1,4,7,10-Tetraazacyclododecane-1,4,7-triacetic-10-(methylphosphonic Acid)), a Monophosphonate Analogue of H₄dota". *Collect. Czechoslov. Chem. Commun.* **70**, 1909–1942 (2005).
- [17] Campello, M. P. *et al.* "Lanthanide(III) Complexes of 2-[4,7,10-Tris(phosphonomethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1-yl] acetic Acid (H₇DOA3P): Multinuclear-NMR and Kinetic Studies". *Helv. Chim. Acta* **92**, 2398–2413 (2009).
- [18] Ševčík, R. *et al.* "Formation and decomplexation kinetics of copper(II) complexes with cyclen derivatives having mixed carboxylate and phosphonate pendant arms". *Dalt. Trans.* **45**, 12723–12733 (2016).
- [19] Kálmán, F. K. *et al.* "Synthesis, potentiometric, kinetic, and NMR studies of 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,7-bis(acetic acid)-4,10-bis(methylenephosphonic acid) (DO2A2P) and its complexes with Ca(II), Cu(II), Zn(II) and lanthanide(III) ions". *Inorg. Chem.* **47**, 3851–3862 (2008).
- [20] Campello, M. P. C. *et al.* "Lanthanide(III) complexes of 4,10-bis(phosphonomethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,7-diacetic acid (trans-H₆do2a2p) in solution and in the solid state: structural studies along the series.". *Chem. Eur. J.* **16**, 8446–8465 (2010).
- [21] Peters, J. A., Huskens, J. & Raber, D. J. "Lanthanide induced shifts and relaxation rate enhancements". *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **28**, 283–350 (1996).
- [22] Kotek, J. *et al.* "Lanthanide(III) Complexes of Novel Mixed Carboxylic-Phosphorus Acid Derivatives of Diethylenetriamine: A Step towards More Efficient MRI Contrast Agents". *Chem. - A Eur. J.* **9**, 5899–5915 (2003).
- [23] Peters, J. A. "Analysis of Multinuclear Lanthanide-Induced Shifts. 4. Some Consequences of the Lanthanide Contraction". *J. Magn. Reson.* **68**, 240–251 (1986).
- [24] Geraldès, C. F. G. C., Sherry, A. D. & Kiefer, G. E. "The Solution Structure of Ln(DOTP)⁵⁻ Complexes. A Comparison of Lanthanide-Induced Paramagnetic Shifts with the MMX Energy-Minimized Structure". *J. Magn. Reson.* **97**, 290–304 (1992).
- [25] Aime, S. *et al.* "Nuclear magnetic resonance, luminescence and structural studies of lanthanide complexes with octadentate macrocyclic ligands bearing benzylphosphinate groups". *J. Chem. Soc., Dalt. Trans.* 3623–3636 (1997).
- [26] Kývala, M. & Lukeš, I. "Solution Equilibria Analysis with the OPIUM Computer Program". (Pardubice, 1995).
- [27] Li, C. & Wong, W. T. "A selective one-step synthesis of tris N-alkylated cyclens". *Tetrahedron* **60**, 5595–5601 (2004).
- [28] Manning, H. C. *et al.* "Expeditious synthesis of 'P'-protected macrocycles en route to lanthanide chelate metal complexes". *Tetrahedron Lett.* **46**, 4707–4710 (2005).
- [29] Bárta, J. "Diplomová práce". (Univerzita Karlova, 2010).
- [30] Bellouard, F. *et al.* "cis-Diprotected cyclams and cyclens: a new route to symmetrically or asymmetrically 1,4-disubstituted tetraazamacrocycles and to asymmetrically tetrasubstituted derivatives". *J. Chem. Soc. - Perkin Trans. 1* 3499–3505 (1999).
- [31] Geraldès, C. F. G. C., Sherry, A. D. & Cacheris, W. P. "Synthesis, Protonation Sequence, and NMR Studies of Polyazamacrocyclic Methylenephosphonates". *Inorg. Chem.* **28**, 3336–3341 (1989).

- [32] Kotecký, J. *et al.* "Bis(methylphosphonic acid) derivatives of 1,4,8,11-tetraazacyclotetradecane (cyclam). Synthesis, crystal and molecular structures, and solution properties". *Collect. Czech. Chem. Commun.* **65**, 1289–1316 (2000).
- [33] Pniok, M. *et al.* "Thermodynamic and Kinetic Study of Scandium(III) Complexes of DTPA and DOTA: A Step Toward Scandium Radiopharmaceuticals". *Chem. Eur. J.* **20**, 7944–7955 (2014).
- [34] Marques, F. *et al.* "13- and 14-membered macrocyclic ligands containing methylcarboxylate or methylphosphonate pendant arms: Chemical and biological evaluation of their ^{153}Sm and ^{166}Ho complexes as potential agents for therapy or bone pain palliation". *J. Inorg. Biochem.* **100**, 270–280 (2006).
- [35] Burai, L., Fábrián, I., Király, R., Szilágyi, E. & Brücher, E. "Equilibrium and kinetic studies on the formation of the lanthanide(III) complexes, $[\text{Ce}(\text{dota})]^-$ and $[\text{Yb}(\text{dota})]^-$ (H_4dota 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid)". *J. Chem. Soc., Dalt. Trans.* 243–248 (1998).
- [36] Sherry, A. D. *et al.* "Characterization of Lanthanide(III) DOTP Complexes: Thermodynamics, Protonation, and Coordination to Alkali Metal Ions". *Inorg. Chem.* **35**, 4604–4612 (1996).
- [37] Anderegg, G., Arnaud-Neu, F., Delgado, R., Felcman, J. & Popov, K. "Critical evaluation of stability constants of metal complexes of complexones for biomedical and environmental applications** (IUPAC Technical Report)". *Pure Appl. Chem.* **77**, 1445–1495 (2005).
- [38] Delgado, R., Costa, J., Guerra, K. P. & Lima, L. M. P. "Lanthanide complexes of macrocyclic derivatives useful for medical applications". *Pure Appl. Chem.* **77**, 569–579 (2005).
- [39] Tóth, E. & Brücher, E. "Stability constants of the lanthanide(III)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane- $\text{N},\text{N}',\text{N}'',\text{N}'''$ -tetraacetate complexes". *Inorganica Chim. Acta* **221**, 165–167 (1994).
- [40] Svobodová, I., Piskula, Z., Lubal, P., Lis, S. & Hermann, P. "Dissociation kinetics study of Ce(III) complexes with H_8dotp (H_8dotp = 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetrakis(methylphosphonic acid))". *J. Alloys Compd.* **451**, 42–45 (2008).
- [41] Rohovec, J. *et al.* "Synthesis, crystal structures and NMR and luminescence spectra of lanthanide complexes of 1,4,7,10-tetraazacyclododecane with N-methylene(phenyl)phosphinic acid pendant arms". *J. Chem. Soc., Dalt. Trans.* 3585–3592 (1999).
- [42] Tóth, E., Helm, L. & Merbach, A. *The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging*. **221**, (John Wiley & Sons, 2002).
- [43] Brücher, E., Laurenczy, G. & Makra, Z. "Studies on the Kinetics of Formation and Dissociation of the Cerium(III)-DOTA Complex". *Inorganica Chim. Acta* **139**, 141–142 (1987).

Pod'akovanie

Na záver tejto práce by som rada napísala pár vďačných slov. Zo všetkého najskôr chcem poďakovať mojim úžasným rodičom, ktorí mi boli oporou vo všetkom, čo ma v živote stretlo. Mami, tati, ďakujem. Bez Vás by som to nezvládla.

Môjmu školiteľovi prof. Petrovi Hermannovi ďakujem za ochotu túto prácu viesť a za mnohé cenné rady, ktoré mi poskytol.

Moje veľké poďakovanie patrí kolegom z veľkého aj malého labu, za ich ochotu vždy mi pomôcť a skvelé prostredie, ktoré vytvárajú. Je radosť s Vami pracovať (či prokrastinovať). Inak – Eliška, Kubo – stále čakám na „PJP“, do leta to hádam stihneme.

(Najlepšiemu) Filipovi chcem poďakovať za moc, moc vecí. Za množstvo pokročilých NMR experimentov, kvôli ktorým ochotne zostával v škole dlho do noci, za jeho početné rady, poznámky a „preslovy“, ktoré mi vždy zdvihli náladu a pomohli to celé vydržať. Ale hlavne – ďakujem mu za to, že je skvelým priateľom, ktorý to so mnou posledné mesiace nemal ľahké, ale aj napriek tomu ma podporoval a pomáhal mi, ako to len šlo.

Veľká vďaka tiež patrí Jane za „kurz“ potenciometrických titrácií a ich následné počítanie a Ondrovi za meranie hmotnostných spektier.

Nie je možné v tomto priestore vymenovať všetkých ľudí, ktorým som vďačná už len za to, že sú, ale verím že oni aj bez toho vedia, že tomu tak je.